

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA EN YUCA**  
**(*Manihot esculenta* Crantz) AL ATAQUE DEL ÁCARO VERDE**  
**(*Mononychellus tanajoa*): UNA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA**

**JAIME ALBERTO MARIN COLORADO**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS – BIOLOGÍA**  
**SANTIAGO DE CALI**  
**2015**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA EN YUCA**  
**(*Manihot esculenta* Crantz) AL ATAQUE DEL ÁCARO VERDE**  
**(*Mononychellus tanajoa*): UNA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA**

**JAIME ALBERTO MARIN COLORADO**

**Trabajo de tesis como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias -**  
**Biología**

**Dirigido por:**

**JAMES MONTOYA LERMA, PhD.**

**HERVE VANDERSCHUREN, PhD.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS – BIOLOGÍA**  
**SANTIAGO DE CALI**

**2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al ETH, porque ha sido una gran escuela, muy especialmente al Dr. Herve Vanderschuren y al Profesor Wilhelm Gruissem por la oportunidad de hacer parte de mi tesis de doctorado en esta gran universidad.

A la Universidad del Valle y sus profesores.

Al Profesor James Montoya Lerma por creer en mí y mis ideas, gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo mi doctorado y por su apoyo permanente.

A COLCIENCIAS, las Becas Francisco José de Caldas. Un gran agradecimiento por el apoyo financiero para la realización de mis estudios doctorales.

Al Dr. Aturo Carabalí, por toda su asesoría, conocimiento, experiencia en la parte experimental de la tesis.

A los Drs. Marcela Santaella, Adalberto Sánchez y Manuel Ospina por sus valiosos aportes y correcciones del documento de tesis.

A el Postgrado de Biología, especialmente a la profesora Alba Marina Torres por su apoyo. Y a todas las personas del departamento de Biología. A los compañeros del posgrado.

A la sección de Entomología, a todos los profesores: Patricia Chacon, Inge Ambercht, Nacy Carrejo, María del Carmen Zúñiga, Carmen Elisa Possu, Ranulfo González. Y compañeros de la sección.

A los grupos de investigación GIE y GEHANA de la Universidad del Valle.

A CIDEIM, muy especialmente a la Dra. Nancy Saravia y la Dra. Clara Ocampo, por su valiosa colaboración en este trabajo de investigación.

A mis compañeros de trabajo en CIDEIM; Paola Caicedo, Mildred Serrato, Julieth Mina y Luis Ramírez por toda su colaboración.

A Adriana Álzate y a Adriano Muñoz por su ayuda en todo lo relacionado con la parte inicial del trabajo.

A mis grandes amigos Isabel Moreno, Jorge Pachón y Mario Salazar por su compañía y amistad.

**Dedico esta tesis muy especialmente:**

**A mis padres, Elvia Colorado de Marín y Rodrigo Marín Tabares**

**A mis Hermanos, Víctor Marín y Juan Carlos Marín**

**A Martha Herrera y mi sobrina querida María Alejandra Marín**

**A toda mi familia**

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	24
<b>Hipótesis</b>	27
<b>Objetivos (Generales y específicos)</b>	28
<b>1 Marco de Referencia: Aspectos generales de la interacción yuca (<i>manihot esculenta</i> crantz) – ácaro verde (<i>Mononychellus tanajoa</i>)</b>	29
1.1 El cultivo de yuca y su importancia	29
1.1.1 Ácaros fitófagos que atacan yuca	30
1.1.2 El ácaro verde ( <i>Mononychellus tanajoa</i> )	30
1.1.3 Resistencia varietal al ácaro verde	31
1.1.4 Pubescencia en genotipos de yuca	32
1.2 Mecanismos de defensa de las plantas	32
1.3 Resistencia en plantas	33
1.3.1 Inmunidad en plantas a insectos herbívoros	34

1.3.1.1 Daño mecánico versus herbivoría	34
1.3.1.2 Secreciones orales de insectos	34
1.3.1.3 Resistencia mediada por genes R	35
1.3.1.4 Flujo de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potencial de membrana y proteínas quinastas “Mitogen-activated (MAPK)”	36
1.3.1.5 Funciones de los jasmonatos (JA) en inmunidad de plantas a artrópodos	36
1.3.1.6 Señalización sistémica	37
1.3.2 Las fitohormonas de defensa	37
1.3.2.1 Jasmonatos (JA)	38
1.3.2.2 El ácido salicílico (AS)	38
1.3.2.3 El ácido abscísico (ABA)	39
1.3.2.4 Las auxinas (AIA)	39
1.3.2.5 Las giberelinas (GB)	40
1.3.2.6 Las citoquininas (CQ)	40
1.3.2.7 Los brasinoesteroides (BR)	41
1.3.3 Respuestas de defensa directas	41

1.3.3.1 Metabolitos secundarios	41
1.3.3.2 Proteínas de defensa	42
1.3.4 Compuestos volátiles como mediadores de defensas	43
1.3.5 Estudios moleculares de la interacción planta-ácaro	43
1.4 Las tecnologías ómicas en yuca	44
1.5 Proteómica	45
1.5.1 Cuantificación de proteínas usando libre marcaje, espectrometría de masas (“Label-Free MS”)	47
1.5.2 Bioinformática	48
1.5.2.1 Bases de datos primarias de secuencias de proteínas	48
1.5.2.2 Bases de datos secundarias	50
<b>2 MODELO METODOLÓGICO</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Niveles de Resistencia al ácaro verde (<i>Mononychellus tanajoa</i>), en el germoplasma de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)</b>	<b>51</b>
2.1.1 Sitio de trabajo, material vegetal y ácaro verde	51
2.1.2 Estrategia para la Evaluación Fenotípica	52
2.1.3 Ensayos en cuarto de cría e invernadero	53



2.1.3.1 Evaluación fenotípica de germoplasma de yuca	54
2.1.3.1.1 Generación de plantas <i>in vitro</i> de los 10 genotipos de yuca	54
2.1.3.1.2 Ensayos a libre y no libre escogencia para preferencia de oviposición	55
2.1.3.1.2.1 Experimento I	56
2.1.3.1.2.2 Experimento II	57
2.1.3.1.2.3 Tiempos de desarrollo	57
2.1.3.2 Análisis estadístico	58
<b>2.2 Análisis proteómico de la respuesta direccional en la interacción yuca</b>	
<b>(<i>Manihot esculenta</i> Crantz) – ácaro verde (<i>Mononychellus tanajoa</i>)</b>	<b>59</b>
2.2.1 Análisis proteómico	59
2.2.1.1 Estrategia para análisis “Label-Free MS”	59
2.2.2 Secuenciación y análisis bioinformático	61
2.2.3 Análisis Label-Free MS	62
2.2.3.1 Extracción de proteínas	62
2.2.3.2 Cuantificación de proteínas	62

2.2.3.3 Preparación y corrida del gel en una dimensión (1DE)	62
2.2.3.4 Fijación, teñido y desteñido de los geles	63
2.2.3.5 Escaneo de imagen del gel	63
2.2.3.6 Corte de fracciones del gel	63
2.2.3.7 Digestión de proteínas	63
2.2.3.8 Purificación de péptidos	63
2.2.3.9 Análisis mediante espectrometría de masas	64
2.2.3.10 Identificación de péptidos y proteínas mediante investigación en bases de datos	64
2.2.4 Análisis estadístico de datos Label-Free MS	65
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Niveles de Resistencia al ácaro verde, <i>Mononychellus tanajoa</i>, en el germoplasma de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)</b>	<b>67</b>
3.1.1 Preferencia oviposición y rango de oviposición	67
3.1.2 Rango de Oviposición	70
3.1.3 Tiempo de Desarrollo y proporción de hembras	70

3.1.4 Preferencia de oviposición/libre escogencia	74
3.1.5 Preferencia de oviposición/no libre escogencia	75
<b>3.2 Análisis proteómico de la respuesta unidireccional en la interacción yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) – ácaro verde (<i>Mononychellus tanajoa</i>)</b>	<b>76</b>
3.2.1 Análisis de cambio de proteínas durante la interacción yuca – ácaro verde	77
3.2.2 Proteínas reguladas a las 6hs, 24hs, 4 días y 8 días después del ataque	78
3.2.3 Clasificación de proteínas dentro de rutas metabólicas	79
3.2.4 Proteínas reguladas relacionadas con estrés biótico	83
3.2.4.1 Proteínas de defensa	84
3.2.5 Activación de proteínas de defensa	86
3.2.5.1 Proteínas relacionadas con patogenicidad (PR)	86
3.2.5.1.1 Quitinasa básica ( <i>CHIB1</i> o <i>PR-3</i> )	86
3.2.5.2 Regulación de proteínas de defensa inducidas por JA, ET y SA	86
3.2.5.2.1 <i>Mononychellus tanajoa</i> induce las vías de JA/ET, AS, Auxinas, Brasinoesteroides, ABA en yuca	89
3.2.5.3 Estrés oxidativo	89

3.2.5.3.1 <i>Mononichellus tanajoa</i> , induce en yuca, enzimas que están involucradas en la generación y detoxificación de ROS	91
3.2.5.4 Factores de transcripción	91
3.2.5.5 Flujo de iones calcio (Ca <sup>2+</sup> ) y proteínas kinasas mitogen-activated (MAPK)	92
3.2.5.6 Señalización	93
3.2.5.7 Proteínas de reconocimiento	95
3.2.5.8 Biosíntesis y modificación de pared celular	95
3.2.5.9 Metabolitos secundarios	97
3.2.5.10 Proteólisis	98
<b>4 DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>100</b>
4.1 Modelo hipotético propuesto para NAT31	123
4.2 Modelo hipotético propuesto para 60444	124
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>127</b>
<b>6 PERSPECTIVAS</b>	<b>130</b>
6.1 Validación de las proteínas mediante Western blot	130
6.2 Identificación y caracterización de inductores en la cascada de	

señalización del ácaro verde	130
6.3 Identificación y caracterización funcional de la señalización de defensa en la yuca ante el ataque del ácaro verde	130
6.3.1 Confirmación de los datos proteómicos obtenidos bajo condiciones de invernadero en campo	131
6.4 Validación de genes mediante Transformación genética	131
6.4.1 Silenciamiento de genes	131
6.4.1.1 Silenciamiento y Sobreexpresión de genes relacionados con Atracción de Enemigos Naturales	132
6.4.1.2 Silenciamiento y Sobreexpresión de genes relacionados con la Respuesta Hipersensible	132
6.4.1.3 Silenciamiento y Sobreexpresión de genes relacionados con el Reforzamiento de Pared Celular	132
6.4.1.4 Silenciamiento y Sobreexpresión de genes relacionados con el Reconocimiento	133
6.4.1.5 Silenciamiento y Sobreexpresión de genes relacionados con Resistencia	133
6.4.2 Genética reversa	133
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>134</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genotipos seleccionados para la evaluación al ataque del ácaro verde.	51
Tabla 2. Tipo de muestras, tiempos y comparaciones entre tiempos.	61
Tabla 3. Permanencia de hospedero (No. hembras/día/genotipo) y preferencia de oviposición medido por No. huevos/genotipo y promedio de rango de oviposición de <i>M. tanajoa</i> sobre 10 genotipos de <i>M. esculenta</i> en una primera selección para ambos a libre (línea arriba) y no-libre escogencia (línea inferior).	67
Tabla 4. Segunda selección de la característica con los genotipos seleccionados, preferencia de oviposición y rango de oviposición (huevos/hembra/2 días) de <i>M. tanajoa</i> sobre cinco genotipos de yuca comparado con CMC-40.	69
Tabla 5. Tiempo de desarrollo, y proporción de hembra <i>M. tanajoa</i> .	71
Tabla 6. Tiempo de desarrollo por estadios de <i>M. tanajoa</i> sobre genotipos de yuca y el material susceptible CMC40.	71
Tabla 7. Proteínas inducidas y reprimidas ( $p < 0.01$ ) en los genotipos NAT31 (resistente) y 60444 (susceptible).	79
Tabla 8. Clasificación y número de genes por categorías funcionales inferidas por OG, obtenidos en respuesta de los materiales NAT31 y 60444 al ataque de <i>M. tanajoa</i> .	80

## **LISTA DE TABLAS SUPLEMENTARIAS**

Tabla suplementaria 1. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en defensa para el genotipo NAT31. 177

Tabla suplementaria 2. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en defensa para el genotipo 60444. 177

Tabla suplementaria 3. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en metabolismo de hormonas para el genotipo NAT31. 177

Tabla suplementaria 4. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. 178

Tabla suplementaria 5. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en estrés oxidativo para el genotipo NAT31. 179

Tabla suplementaria 6. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en estrés oxidativo para el genotipo 60444. 179

Tabla suplementaria 7. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en factores de transcripción para el genotipo 60444. 180

Tabla suplementaria 8. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en MAPKinasas para el genotipo NAT31. 180

Tabla suplementaria 9. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en MAPKinasas para el genotipo 60444. 180

Tabla suplementaria 10. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en señalización para el genotipo NAT31.	181
Tabla suplementaria 11. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en señalización para el genotipo 60444.	182
Tabla suplementaria 12. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en genes R para el genotipo NAT31.	183
Tabla suplementaria 13. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en biosíntesis y modificación de pared celular para el genotipo NAT31.	183
Tabla suplementaria 14. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en biosíntesis y modificación de pared celular para el genotipo 60444.	184
Tabla suplementaria 15. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en el metabolismo secundario para el genotipo NAT31.	185
Tabla suplementaria 16. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en metabolismo secundario para el genotipo 60444.	186
Tabla suplementaria 17. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en proteólisis para el genotipo NAT31.	187
Tabla suplementaria 18. Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en proteólisis para el genotipo 60444.	188



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cuarto de cría en donde se estableció la colonia de ácaro verde, *M. tanajoa*. Bajo condiciones controladas ( $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR y 12 h de fotoperiodo). 53
- Figura 2. Invernaderos para la aclimatación de plantas de yuca que venían de propagación *in vitro*. 53
- Figura 3. Cuarto de propagación de las plantas de yuca (A. zona de preparación de medio de cultivo, B. área de propagación, C.D. cuartos de crecimiento, propagaciones, E.F. Material de yuca propagado). 55
- Figura 4. Diseño del experimento en cajas de Petri. A. Ensayo a libre escogencia, B. Ensayo a no libre escogencia en evaluación para los 10 genotipos de yuca ubicados de forma aleatoria. 56
- Figura 5. Diseño del experimento en cajas de Petri. A. Ensayo a libre escogencia, B. Ensayo a no libre escogencia para los cinco genotipos seleccionados en el experimento II. 57
- Figura 6. Unidades experimentales utilizadas en el tiempo de desarrollo de *M. tanajoa*. 58
- Figura 7. Tiempos de desarrollo para los 10 genotipos evaluados para la resistencia/tolerancia al ácaro verde. 73
- Figura 8. Preferencia de oviposición del ácaro verde en experimento I: (A) en ensayos a libre y (B) no libre escogencia para preferencia de oviposición. 74
- Figura 9. Preferencia de oviposición del ácaro verde en experimento II: (A) En ensayos a libre y (B) no libre escogencia. 75

Figura 10. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en respuesta de defensa entre los materiales NAT31 y 60444. 85

Figura 11. Gráfico de barras donde se muestra la distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en metabolismo de hormonas. 88

Figura 12. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en estrés oxidativo. 90

Figura 13. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en factores de transcripción para el genotipo 60444. 92

Figura 14. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en MAPK. 93

Figura 15. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en señalización. 94

Figura 16. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en reconocimiento-genes R solamente para NAT31. 95

Figura 17. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en biosíntesis y modificación de pared celular. 97

Figura 18. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en el metabolismo secundario. 98

Figura 19. Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en proteólisis. 99

Figura 20. Modelo hipotético del mecanismo de respuesta propuesto para el genotipo NAT31. 124

Figura 21. Modelo hipotético del mecanismo de respuesta propuesto para el genotipo 60444. 126

## LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo NAT-31 a las 6 horas de evaluación. _____	189
Figura suplementaria 2. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo NAT-31 a las 24 horas de evaluación. _____	189
Figura suplementaria 3. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo NAT-31 a los 4 días de evaluación. _____	190
Figura suplementaria 4. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo NAT-31 a los 8 días de evaluación. _____	190
Figura suplementaria 5. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo 60444 a las 6 horas de evaluación. _____	191
Figura suplementaria 6. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo 60444 a las 24 horas de evaluación. _____	191
Figura suplementaria 7. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo 60444 a los 4 días de evaluación. _____	192
Figura suplementaria 8. Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo 60444 a los 8 días de evaluación. _____	192

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo A: Diseño del experimento a no libre escogencia para los análisis proteómicos.	193
Anexo B: Extracción de proteína con SDS y buffer úrea.	197
Anexo C: Estimación de concentración de proteína mediante colorimetría con ensayos de BCA proteína.	198
Anexo D: Preparación y corrida del gel en una dimensión (1DE).	199
Anexo E: Digestión trípica y extracción de péptidos.	200
Anexo F: Purificación de péptidos (Protocolo ZIPTIP).	202

## RESUMEN

El ácaro verde, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae), es una de las principales plagas de la yuca, causando daños directamente al chupar la savia. Aunque tiene una amplia distribución en América Latina, África y el alto potencial de extenderse a Asia, Indonesia y Oceanía, muy poca información está disponible para establecer un plan de manejo integrado de plagas. En consecuencia, los objetivos del presente estudio fueron: (1) cuantificar los efectos de los niveles de resistencia con bioensayos a libre y no libre escogencia para la preferencia de oviposición y (2) generar un amplio mapa del proteoma del tejido fotosintético de yuca utilizando la proteómica cuantitativa de etiquetado libre en diez genotipos del banco de germoplasma de yuca. Un total de 5320 y 5490 proteínas únicas, fueron identificadas en las hojas de yuca de los genotipos NAT31 y 60444, respectivamente. Además, alrededor de 300 y 1.100 proteínas mostraron una regulación estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ , máximo cambio de regulación 2,0), durante la interacción con el ácaro verde. Se identificaron proteínas moduladas en vías asociadas con genes de defensa, el estrés oxidativo, la señalización, la biosíntesis y la modificación de la pared celular, el metabolismo secundario, proteólisis, factores de transcripción y genes de reconocimiento. Con base en la combinación de datos del fenotipo y proteómicos, se identificaron varias proteínas relacionadas con el mecanismo de defensa durante la interacción ácaro verde y yuca. Datos de proteómica cuantitativa de las vías de defensa y fenilpropanoides indican genes candidatos adicionales para retrasar aún más el ataque del ácaro verde. Los datos de proteómica de las hojas de yuca están disponibles en [www.pep2pro.ethz.ch](http://www.pep2pro.ethz.ch) para facilitar el acceso y la comparación con los datos de otros proteomas.

**Palabras claves:** Oviposición, *Manihot esculenta*, plagas, Label Free, Progenesis, MapMan, NAT31, 60444, Colombia.

## SUMMARY

The green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae), is one of the main pests of cassava, causing damage directly by sucking the sap. Although it has a wide distribution in Latin America, Africa and high potential to extend to Asia, Indonesia and Oceania, very little information is available to establish an integrated pest management plan. Accordingly, the objectives of the present study were: (1) to quantify effects of the levels of resistance with non-free and free choice bioassays for oviposition preference and (2) to generate an extensive proteome map of cassava photosynthetic tissue using label-free quantitative proteomics on ten genotypes at cassava germplasm bank. Over 5320 and 5490 unique proteins, were identified in the cassava leaf of genotypes NAT31 and 60444, respectively. In addition, around 300 and 1100 proteins showed significant abundance ( $p < 0.01$ ; max fold change 2,0) regulation during interaction with green mite. We identified protein abundance modulation in pathways associated with defense genes, oxidative stress, signaling, biosynthesis and modification of cell wall, secondary metabolism, proteolysis, transcription factors and genes of recognition. Based on combined phenotype and proteomics data, we identified several proteins related to defense mechanism during the cassava green mite interaction. Quantitative proteomics data from defense and phenylpropanoid pathways indicate additional gene candidates to further delay green mite attack. Cassava leaf proteomics data are available at [www.pep2pro.ethz.ch](http://www.pep2pro.ethz.ch) for easy access and comparison with other proteomics data.

**Keywords:** Oviposition, *Manihot esculenta*, pest, Label Free, Progenesis, MapMan, NAT31, 60444, Colombia.

## INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne originario de Sur América. En 2008 su producción mundial alcanzó cerca de las 280 millones de toneladas (Nhassico et al., 2008, FAO, 2012). Esta es fuente esencial de carbohidratos para más de 800 millones de personas en países tropicales en vías de desarrollo (FAO, 2009; Nhassico et al., 2008; Stupak et al., 2006). Además de su uso en la dieta humana, tiene importancia en la industria de productos procesados (Balagopalan, 2002), de alimentos para animales, de etanol y almidón (Jansson et al., 2009; Ceballos et al., 2006). Sin embargo, su producción es afectada por cerca de 200 especies de artrópodos asociadas al cultivo (Bellotti & Van Schoonhoven, 1978a; 1978b; Bellotti et al., 2010; Bellotti et al., 2012) entre ellas, el ácaro verde (AVY) (*Mononychellus tanajoa*). Esta especie es una de las más importantes y limitantes (Bellotti et al., 1983c; Bellotti et al., 2002; Bellotti, 2008), en cuanto que se considera que ha coevolucionado con el cultivo (Bellotti, 2002) al punto de adaptarse, de varias formas a las barreras físicas y químicas como lo son los compuestos laticíferos y cianogénicos, claves en la defensa bioquímica natural de la planta (Bellotti & Riis 1994).

El nivel de daño generado por el ácaro verde en campos de cultivo de yuca, depende de las condiciones ambientales, la fertilidad del suelo, la edad de la planta, el tipo y duración del ataque. Afecta negativamente el rango fotosintético e incide sobre la producción del cultivo, induciendo pérdidas económicas (Bellotti, 2000; Bellotti et al., 1994). Investigaciones en campo revelan que los ataques largos (entre 3-6 meses) de ácaro verde, pueden causar hasta un 79% de pérdida en la producción de raíz (Bellotti et al., 1999). Cuando ataca la parte aérea de la planta, siendo la única parte de la planta de la cual se alimenta, ocasiona daños severos y, como consecuencia, pérdidas en el rendimiento. Lo anterior conlleva a reducción en la actividad fotosintética hasta en un 90%, pérdida de la longevidad foliar hasta en un 78% y reducción en el tamaño de la hoja hasta en un 65%, por consiguiente, reducción en el rendimiento de raíces entre un 20-87%. También, según la variedad, la edad de la planta y la duración del ataque, se afectan la calidad y cantidad del material de siembra y la estaca (Bellotti, 2000; Bellotti et al., 1999).



La gran mayoría de agricultores y productores usan insecticidas (Arias, 1995; CIAT, 2006) usualmente con múltiples aplicaciones, convirtiéndose en un arma de doble filo en el control de las poblaciones del ácaro verde, ya que con el uso continuo de insecticidas el ácaro genera tolerancia al químico, implicando un esfuerzo perdido. El uso indiscriminado de dichos productos conlleva a grandes efectos negativos sobre muchos organismos benéficos e inducen cierto grado de resistencia de las plagas. Además, en términos generales, se incrementan los costos de producción y los niveles de contaminación ambiental (Panda & Khush, 1995) con impactos negativos en la salud pública (Arias & Guerrero, 2000). Por lo tanto, el control biológico, las prácticas culturales y la resistencia del hospedero son claves para el diseño de un manejo integrado de plagas apropiado para producción de yuca (Bellotti et al., 1999; Faria & Wraight, 2001).

Entre 1960 y 1980, la Revolución Verde implementó en su manejo el uso de cultivares mejorados y agroquímicos para generar cultivos con rendimientos óptimos. Aunque se llegó a duplicar la producción en varios cultivos como el maíz, el arroz y el trigo en muchas regiones del mundo, especialmente en Asia y América Latina, también se generaron serios problemas sociales y ecológicos, como envenenamientos y enfermedades, pérdida en la biodiversidad agrícola e impactos en la salud pública y gran gasto económico en la compra de agroquímicos (Bellotti et al., 1999). En el momento se propende por el manejo integrado, el cual incluye el uso del mejoramiento convencional asistido por la biología molecular para generar y transferir niveles de resistencia a cultivares con características agronómicas deseables (Fregene et al., 2006).

El banco de germoplasma del CIAT tiene décadas dedicadas a la investigación, caracterizando la respuesta de miles de accesiones a los artrópodos plagas que afectan el cultivo de yuca (Bellotti, 2008). Recientemente, en *M. peruviana*, *M. flabellifolia* y *M. tristis*, especies silvestres de *Manihot*, se demostró la existencia de ciertos niveles de tolerancia al ácaro verde (Macea, 2007; Burbano et al., 2007; FAO, 2007). Bellotti et al. (1977), en una de las primeras investigaciones en resistencia/tolerancia varietal en yuca contra los ácaros verdes, encontraron niveles moderados de tolerancia de clones de yuca a esta plaga, base para estudios posteriores (Byrn et al., 1982; Bellotti & Kawano, 1983b; Bellotti et al., 1994; CIAT, 1999; 2004). En la actualidad, el potencial genético del banco

de germoplasma puede ser evaluado a través de nuevas herramientas de mapas genéticos moleculares, mapas físicos y avanzados esquemas de mapeo de QTLs en retrocruces (ABC-QTL) (análisis de agrupamiento-loci de caracteres cuantitativos). Macea (2007), evaluó retrocruces BC<sub>1</sub> del cruce entre los parentales MFLA 437-007 (material tolerante reportado y evaluado como tolerante al AVY) y MTAI-8 (variedad con gran susceptibilidad a la misma plaga), para identificar marcadores moleculares asociados a la resistencia al AVY. Con estas herramientas se puede identificar y asociar con el gen de interés, simplificando el tiempo consumido en evaluaciones de ensayos repetidos para identificar el fenotipo. Los marcadores moleculares también permiten la identificación de progenies que presentan el gen de interés, con la mínima introgresión del genoma del pariente silvestre para una más eficiente estrategia de retrocruce (Okogbenin et al., 2008).

El presente estudio tuvo como objetivos descifrar proteínas reguladas involucradas en la resistencia de la planta hospedera (yuca) ante el ataque del ácaro verde, con el fin de dilucidar y entender el mecanismo de defensa. Este trabajo es la primera aproximación proteómica mediante la metodología “label-free MS” (espectrometría de masas) para el ácaro verde, relacionada con las proteínas que genera la planta cuando es atacada por el artrópodo. Para lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos, general: Caracterizar molecularmente la resistencia de yuca al ataque del ácaro verde, mediante una aproximación ómica (proteómica). Y específicos; 1. Caracterizar el efecto de los cultivares susceptibles y resistentes sobre el desarrollo del ácaro verde en yuca, y 2. Caracterizar las proteínas en accesiones resistentes y susceptibles en el momento del ataque sobre el sistema ácaro verde – yuca.

## **Hipótesis**

### **Sección I: El tipo de resistencia generado en el sistema yuca-ácaro verde.**

H1: La resistencia generada por yuca ante el ataque del ácaro verde es de tipo inducida.

### **Sección II: Proteínas expresadas en la planta para el sistema yuca-ácaro verde.**

H2: Las proteínas expresadas en el momento del ataque de la plaga en el sistema yuca-ácaro verde difieren entre variedades susceptibles y resistentes.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Caracterizar molecularmente la resistencia de yuca al ataque del ácaro verde, mediante una aproximación proteómica.

### **ESPECÍFICOS**

- Caracterizar el efecto de los cultivares susceptibles y resistentes sobre el desarrollo del ácaro verde en yuca.
- Caracterizar y seleccionar las proteínas en cultivares resistentes y susceptibles al momento del ataque sobre el sistema ácaro verde - yuca.

# **1 MARCO DE REFERENCIA: ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN YUCA (*Manihot esculenta* CRANTZ) – ÁCARO VERDE (*Mononychellus tanajoa*)**

## **1.1 El cultivo de yuca y su importancia**

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz), es una Euforbiaceae arbustiva perenne, que se propaga vegetativamente, siendo el único miembro de esta familia cultivado como alimento (Fauquet, 1990). La yuca tiene unas 7.200 especies caracterizadas por el desarrollo de vasos laticíferos, constituidos por células secretoras; galactocitos, lo que ocasiona la secreción lechosa que identifica a esta familia (CIAT, 2002). El género *Manihot* comprende 98 especies (Rogers, 1973), distribuidas en el Neotrópico.

Por su propiedad de acumular almidón en las raíces, la yuca puede presentar un elevado componente de calorías, por consiguiente, su productividad es medida en términos de materia seca, con un rango de 30 a 40% en condiciones para producción normal y cerca del 85% de materia seca almacenada en la raíz es almidón (Cock, 1985). En cuanto a su contenido de proteínas es mínimo, de 1 a 2% en peso fresco, pero es rica en vitamina C y calcio, presenta niveles aceptables de las vitaminas A y B y varios minerales (Cock, 1985). Aunque las dietas basadas en almidón de yuca proveen alrededor de solo el 30% del mínimo requerido diariamente de vitaminas y minerales (Cock, 1985) en realidad es una de las principales fuentes energéticas en la dieta de más de 700 millones de personas en el mundo (Ceballos, 2002). Es, en consecuencia, el cultivo de raíz más importante en los trópicos y sub trópicos especialmente en África subsahariana y cada día aumenta su siembra en muchos países (más de 90), dando subsistencia a quinientas mil personas de países en desarrollo (Kawano, 2003; Cock, 1985).

Por todo lo anterior, la producción de yuca tiene gran importancia económica con implicaciones para la seguridad alimentaria de millones de personas en América Latina, África y Asia (FAO/FIDA, 2000). Sin embargo, su producción es limitada tanto por factores abióticos (suelo, clima, deterioro fisiológico postcosecha y factores agronómicos) como bióticos (enfermedades del veteado café de la yuca (CBSD) y la del mosaico de la

yuca (CMD), ambas transmitidas por moscas blancas (*Bemisia tabaci*), la bacteriosis por *Xanthomonas axonopodis* pv *manitotis* y la antracnosis por *Colletotrichum gleosporoides*. No obstante, otras plagas artrópodas ocasionan serios daños al cultivo, dentro de estos el piojo harinoso (*Phenecoccus manihoti*) y el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) (Bellotti et al., 2002) son de gran relevancia.

### **1.1.1 Ácaros fitófagos que atacan yuca**

La yuca tiene un ciclo de 7 a 24 meses y presenta una serie de plagas que la atacan, que conforman dos grandes grupos: las especialistas, que han coevolucionado con ella, quienes son su hospedero primario o definitivo y las generalistas con ataques esporádicos. Dentro del primer grupo se encuentra el complejo de ácaros del género *Mononychellus* (*M. tanajoa*, *M. mcgregori*, *M. caribbeanae* y *M. planki*). El segundo agrupa aquellas especies que se alimentan tanto de yuca como de otras plantas (Bellotti et al. 2010; Vásquez-Ordoñez & Parsa, 2014) p.e. *Tetranychus urticae*, *T. kawganai* (Filipinas), *Eutetranychus orientalis*, *T. neocalidonicus* y *Oligonychus biharensis* (India) y *Tetranychus* sp. (Indonesia) (Palaniswami et al., 1995).

### **1.1.2 El ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*)**

El ácaro verde es una de las más importantes plagas en el cultivo de yuca en las Américas (Colombia, Venezuela, Perú y, especialmente, Brasil), África (Uganda, Ghana y Nigeria) y con altas posibilidades de distribución al Asia y parte de Oceanía (Indonesia, Filipinas y Nueva Guinea) (Bellotti, 2000; Herrera, 2009). Esta plaga genera daño al insertar sus quelíceros en la superficie de la hoja y al succionar el fluido de las células del parénquima en empalizada y en las del mesófilo esponjoso (Burbano, 2003). Esta especie neotropical se desarrolla sobre los meristemas. En altas poblaciones produce serios daños fisiológicos y económicos al disminuir la producción y calidad en el cultivo. Su presencia y ataque son favorecidos por condiciones secas, uso de variedades susceptibles, fertilización inadecuada y presencia de malas hierbas (Bellotti et al., 1999). Como consecuencia ocasiona reducción en la producción de hasta un 80% (Skovgard et al., 1993; Bellotti et al., 1983a; 1983c).

Burbano (2003) indica que, en variedades de yuca susceptibles, el daño se caracteriza por hojas cloróticas, que aumenta desde unos pocos puntos amarillentos hasta la pérdida completa del pigmento (clorofila). Al alimentarse, el ácaro puede afectar también la distribución, aunque no el contenido de cianuro. Otro síntoma es la presencia de hojas moteadas que mueren y caen. Las plantas fuertemente atacadas se deforman, perdiendo su estructura primaria (desde muy poco hasta un cuarto del tamaño normal) y sus síntomas se confunden con los generados por el virus del mosaico africano de la yuca. Al reducir el área foliar, se disminuye la capacidad fotosintética y la tasa de crecimiento de la planta. Las condiciones secas de altas temperaturas y baja humedad relativa, proporcionan la proliferación de poblaciones de ácaro verde, existiendo una relación directa entre la duración del periodo seco y el ataque (Bellotti & Guerrero, 1977). Las infestaciones de artrópodos plaga se pueden dar, en grados variables, en los campos de pequeños, medianos y grandes agricultores. El desarrollo de genotipos que se puedan usar a nivel regional e internacional, resistentes a plagas y a las nuevas amenazas de las enfermedades en yuca puede disminuir la pérdida que se genera en la producción (Fermont et al., 2009). Esos genotipos resistentes pueden ser llevados a cultivos intensivos y extensivos de yuca.

### **1.1.3 Resistencia varietal al ácaro verde**

De acuerdo a Bellotti et al. (2012), la inmunidad o altos niveles de resistencia no parecen ser viables en el germoplasma de yuca que ha sido evaluado para encontrar resistencia al ácaro verde en varios centros de investigación tanto en América como en África (CIAT, IITA). El CIAT evaluó mas de 5.000 cultivares y sólo 300 (6%) fueron identificados de tener niveles de bajo a moderado de resistencia. Los materiales ICA Costeña y Nataima 31, con bajos niveles de resistencia, han sido cultivados por los agricultores colombianos (Bellotti, 2008). Estudios de mecanismos de resistencia al ácaro verde indican fuerte antixenosis (preferencia vs. no preferencia) para oviposición, también una moderada antibiosis. En ensayos a libre escogencia, realizados por Byrne et al. (1982), al evaluar el material susceptible CMC40 frente a materiales con moderada resistencia (MECU72, MPER611 y MECU64) la oviposición del ácaro fue 95, 91 y 88%, respectivamente, y sobre CMC40 del 100%. Según Byrne et al. (1982), la antibiosis es expresada en los ácaros al

presentar menor fecundidad, largo tiempo de desarrollo y una vida adulta mas corta, y alta mortalidad de larvas y ninfas cuando se alimentan del material resistente.

#### **1.1.4 Pubescencia en genotipos de yuca**

Existen pocos trabajos que evalúen las barreras físicas preformadas que se encuentran en la epidermis de las plantas de yuca. Uno de ellos, Arias (1995) evaluó la característica de resistencia a la mosca blanca empleando el análisis de microscopia electrónica de barrido. Él encontró diferencias en la densidad de pubescencia entre el material susceptible CMC40 con densidades por debajo 189 tricomas/cm<sup>2</sup> y el material resistente ECU72 con densidades por encima 33.000 tricomas/cm<sup>2</sup>, además de una correlación negativa de ( $r = -0,39$ ) entre el grado de daño ocasionado por la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis* Bondar) y la pubescencia.

### **1.2 Mecanismos de defensa de las plantas**

La elucidación de los mecanismos moleculares que generan respuesta en la planta, ante el ataque de la plaga al alimentarse de ésta, potencialmente, puede ser útil para el desarrollo de nuevos métodos que generen antibiosis al artrópodo (Kessler & Baldwin, 2002; Abe et al., 2008).

Existen tres razones para que una plaga no colonice su hospedero:

- A. La planta es incapaz de servir de nicho para una plaga potencial, siendo no hospedero.
- B. La planta posee barreras estructurales preformadas o componentes tóxicos que confinan las infecciones exitosas a especies de plagas especializados (defensa constitutiva).
- C. Basado en el reconocimiento del ataque de la plaga, los mecanismos de defensa son elaborados y la invasión permanece localizada (defensa inducida).

La defensa constitutiva o defensa pasiva o compatible: Dentro de este grupo se encuentran ciertas barreras físicas que impiden el ingreso a los tejidos de la planta de un artrópodo. Ciertas plantas utilizan químicos disuasivos sobre su superficie cuticular (suberinas,



callosa, cutículas), o pueden almacenar componentes tóxicos en vacuolas o tricomas glandulares (aleloquímicos). Estas estructuras preformadas y algunos metabolitos secundarios proveen una defensa inmediata al ataque del insecto evitando la colonización e incremento de las poblaciones, teniendo un efecto antixenótico aunque también puede ser antibiótico, al afectar el crecimiento, reproducción, desarrollo y sobrevivencia de las plagas (Fluhr, 2001). Algunos autores también utilizan el concepto de defensa directa (constitutiva), la cual es cualquier rasgo de la planta (tricomas, metabolitos primarios, secundarios, espinas) que, en sí mismas, afectan la susceptibilidad de la planta al artrópodo o su ataque.

La defensa inducida o activa o incompatible es una respuesta plástica (capacidad para responder a diferentes condiciones de estrés) que se centra hacia una resistencia sistémica duradera y que sirve para un amplio espectro de patógenos y plagas. Mueve toda la maquinaria de la célula relacionada con el ciclo del carbono y nitrógeno, necesaria para el crecimiento y reproducción de la planta, en la defensa inmediata. En el caso de las interacciones planta - patógeno éstas son gobernadas por interacciones entre genes R de la planta que reconocen efectores del patógeno producidos durante la infección (Dangl & Jones, 2001).

### **1.3 Resistencia en plantas**

En plantas, tres hormonas primordiales, i.e. ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (AS) y etileno (ET), se encuentran en una vía de señalización cruzada que puede resultar, de manera antagonista o sinergista, dando a las plantas una herramienta poderosa para regular su respuesta inmune. Recientemente, se ha evidenciado la importancia de hormonas más pequeñas como son el ácido abscísico, las auxinas, las giberelinas, las citoquininas y los brasinoesteroides, también relacionadas con resistencia a artrópodos plaga.

### **1.3.1 Inmunidad en plantas a insectos herbívoros**

El trabajo de De Vos et al. (2005), pionero en evaluar tres tipos de plagas que atacan y se alimentan de forma diferente de *Arabidopsis thaliana* presenta la convergencia de las tres vías de señalización (ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (AS) y etileno (ET)), las cuales tienen un papel primordial en la regulación genética en la interacción planta – patógeno; planta – insectos. Varios trabajos confirman que ante el ataque de artrópodos herbívoros se induce un rango de respuestas de defensa en plantas (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven et al., 2005; Howe & Jander, 2008). Existen varias fases en donde la planta puede reconocer la presencia del artrópodo. Por ejemplo la respuesta al contacto o cuando él camina sobre ella, estudiada por Braam (2005); Bown et al. (1998), entre otros.

#### **1.3.1.1 Daño mecánico versus herbivoría**

Para que la planta pueda diferenciar entre un daño físico o químico y el de la herbivoría, es necesario generar la inducción de genes requeridos para reparación celular y respuesta a estrés osmótico, como resultado de posible herbivoría o daño mecánico. Algunos inductores pueden generar diferencias entre uno u otro, como inductores en la saliva de los artrópodos. El modo, velocidad y frecuencia de tejido dañado pueden ser reconocidos por la planta como señales específicas de herbivoría. Experimentos con microarreglos con varias especies, como *Arabidopsis thaliana* (De Vos et al., 2005), *Nicotiana attenuata* (Voelckel et al., 2004) y especies del género *Populus* (Major & Constabel, 2006), compararon los patrones de expresión génica inducida por daño mecánico con la inducida por la alimentación por insectos o herbivoría simulada. En algunos casos, estas respuestas han sido asociadas con la producción de componentes disuasivos específicos de insectos tales como la nicotina (Hui et al., 2003) y los glucosinolatos (Mewis et al., 2006).

#### **1.3.1.2 Secreciones orales de insectos**

Se ha demostrado que la alimentación por insectos o la aplicación de sus secreciones orales a las heridas inducen diferente y más intensa respuesta de compuestos volátiles que las del

daño mecánico (Arimura et al., 2005; Schmelz et al., 2006). Las plantas pueden beneficiarse de la producción de volátiles específicos de la herbivoría a través de efectos directos disuasivos sobre los herbívoros, como son la atracción de depredadores al sitio de alimentación del insecto así como de señales internas que van al tejido sin infestar e inducen una respuesta de defensa más rápida. Hasta el momento, han sido identificados inductores derivados de insectos, la N-17-hidroxisilinoil-l-glutamina (volicitina) en secreciones orales de *S. exigua*, que le permite inducir la liberación de compuestos volátiles en maíz (*Zea mays*) (Alborn et al., 1997). Este compuesto fue el primer ejemplo de lo que parece ser una amplia producción de conjugados de ácidos grasos y aminoácidos (AGCs) por larvas de lepidópteros (Alborn et al., 2003; Mori et al., 2001). Las respuestas específicas a AGCs en secreciones orales de lepidópteros, incluyendo cambios en expresión génica, alteraciones en el proteoma de la planta y producción inducida de nicotina e inhibidores de proteasas, han sido estudiados más extensamente en *N. attenuata* (Giri et al., 2006; Halitschke et al., 2003).

### **1.3.1.3 Resistencia mediada por genes R**

La resistencia a insectos ha sido identificada en varias especies de plantas (Panda & Khush, 1995; Quisenberry & Clement, 2002). Un gran número de genes R (genes resistentes), por lo general son genes simples dominantes, los cuales han sido mapeados y los marcadores moleculares ligados a esos loci han sido identificados (Jena et al., 2002; Liu et al., 2002; Tan et al., 2004). La mayoría de los genes mapeados están en cultivos primarios como cebada y arroz y, un gran número de ellos, confieren resistencia a la mosca de hess, *Mayetiola destructor*, que junto al áfido *Diuraphis noxia*, son consideradas plagas clave en cebada (Webster et al., 2000). Dos ejemplos claros en respuesta de la planta ante el ataque son los áfidos y las moscas blancas, las cuales usan sus estiletes para succionar savia del floema para obtener sus nutrientes. Ellos no generan un cambio sustancial, pero si cambios notorios en los inductores en señalización y metabolismo secundario (Walling, 2000). Un gen R, *Mi-1* resistente a *Meloidogyne incognita* confiere resistencia a áfidos, moscas blancas (Kaloshian, 2004).

#### **1.3.1.4 Flujo de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potencial de membrana y proteínas quinasas “Mitogen-activated (MAPK)”**

Una de las formas en que las plantas pueden sentir el contacto del artrópodo es mediante la activación en la membrana plasmática de los canales de iones que genera un cambio rápido en la señal citosólica del  $\text{Ca}^{++}$  (Nakagawa et al., 2007; Haswell et al., 2008). El aumento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico puede resultar en el disparo de la señal de transducción la cual conduce a la inducción de genes involucrados en defensa a plantas o a crecimiento (Schaller & Weiler, 2002; Braam, 2005). Mauch et al. (1997) al hacer simulación de contacto en trigo, indujeron significativamente la transcripción de genes que codifican lipoxigenasas, enzimas importantes en la vía octadecanoica inducidas por daño. Por ejemplo, las cerdas de los tarsos de las larvas sobre la planta pueden generar síntesis rápida de ácido  $\gamma$  -aminobutírico (GABA) (Hall et al., 2004). Bouche & Fromm (2004) mencionan varios papeles del GABA en la planta, uno de ellos en defensa contra insectos.

#### **1.3.1.5 Funciones de los jasmonatos (JA) en inmunidad de plantas a artrópodos**

Los jasmonatos (JA) juegan un papel central en la regulación de las respuestas de defensa a herbívoros los cuales infligen varios tipos de daño al tejido. Esta conclusión está basada en numerosos estudios en campo y laboratorio que muestran que los mutantes de JA están comprometidos en resistencia a un amplio rango de herbívoros artrópodos, incluyendo orugas (Lepidoptera), escarabajos, gorgojos (Coleoptera), trips (Thysanoptera), saltahojas (Homoptera), ácaros (Acari), además especies de Diptera y Heteroptera (Bostock, 2005; Howe, 2004; Kessler & Baldwin, 2002). Estudios con microarreglos muestran que la vía de los JA tiene una función dominante en los cambios de regulación globales de la expresión de genes en respuesta a daño mecánico y herbivoría (De Vos et al., 2005; Devoto et al., 2005; Ralph et al., 2006; Reymond et al., 2004). Los JA también están involucrados en interacciones tritróficas (Engelberth et al., 2004; Van Poecke & Dicke, 2002), resistencia en plantas a insectos floemófagos (Mewis et al., 2006; Zarate et al., 2007), defensas basadas en tricomas (Boughton et al., 2005; Li et al., 2004), función en defensas directas e indirectas (Engelberth et al., 2004; Ton et al., 2007), resistencia a patógenos (Glazebrook, 2005) y transmisión sistémica de señales de defensa (Schilmiller & Howe, 2005).

### **1.3.1.6 Señalización sistémica**

Otro de los múltiples mecanismos de defensa ante el ataque de herbívoros por las plantas, es la acumulación de compuestos defensivos no solo en la hoja donde se genera el daño por el herbívoro, también en hojas intactas distantes (sistémico). Una señal viaja a otra parte de la planta y transmite una alerta de herbivoría. Aunque esta respuesta sistémica fue identificada hace más de 40 años la señal móvil aún se desconoce (Green & Ryan, 1972). Muchas defensas inducibles son expresadas en unas pocas horas en hojas sin dañar de plantas que han sido atacadas por herbívoros. Esta respuesta sistémica, documentada en un amplio rango de especies, provee una resistencia efectiva para futuros ataques de insectos (Bostock, 2005; Karban & Baldwin, 1997). Varios trabajos indican que el sistema vascular está involucrado en el transporte de señales móviles (Orians et al., 2000; Schittko et al., 2000). Algunos de estos revelan que la expresión de los inhibidores de proteinasas sistémicos (PI) en *S. lycopersicum* depende de la síntesis de JA en el sitio de la herida y de la percepción de los JA en hojas distales sin daño. Estos y otros estudios apoyan el modelo en el cual los JA actúan como una señal móvil del floema (Schaller et al., 2005).

### **1.3.2 Las fitohormonas de defensa**

Estas son moléculas pequeñas esenciales para la regulación del crecimiento de la planta, desarrollo, reproducción y sobrevivencia, que pueden actuar en bajas concentraciones. Las fitohormonas clásicas son el ácido abscísico (ABA), las auxinas, las citoquininas, el etileno (ET) y giberelinas, pero las pequeñas moléculas de señalización como brasinoesteroides, jasmonatos (JAs) y ácido salicílico (SA) son también reconocidas como hormonas. Hace pocos años se reconoció que las fitohormonas ABA (Asselbergh et al., 2008; Mauch-Mani & Mauch, 2005), auxinas (Navarro et al., 2006; Wang et al., 2007), giberelinas (Navarro et al., 2008), citoquininas (Walters & McRoberts, 2006; Siemens et al., 2006) y brasinoesteroides (Nakashita et al., 2003; Shan et al., 2009), junto con el AS, JAs y ET sirven como señales primarias en la regulación de la respuesta inmune de plantas (Pozo et al., 2004).

### **1.3.2.1 Jasmonatos (JA)**

Los JAs tienen un papel esencial en el desarrollo de la planta y la resistencia a estreses bióticos (Browse, 2009; Howe & Jander, 2008). Los JAs parecen poco importantes para el crecimiento vegetativo de la planta, pero juegan un papel en el sistema inmune al conferir resistencia a patógenos necrotróficos (Kunkel & Brooks, 2002; Vijayan et al., 1998). Varios trabajos transcriptómicos con microarreglos indican que una gran porción de respuestas inducidas por herida y herbivoría son mediadas a través de la vía del JA (Reymond et al., 2000; 2004). Dentro de la cascada de señalización de JA, se incluye la hormona a herida JA-Ile, considerada un regulador de resistencia a plantas a artrópodos herbívoros y a varios patógenos (Howe & Jander, 2008; Koo & Howe, 2009; Adio et al., 2011), y JAs representa la señal núcleo o señal clave en la vía para activar la resistencia a insectos. JA-isoleucina conjugada es identificada como la molécula que activa la mayoría de respuestas moleculares inducidas por JA (Staswick & Tiryaki, 2004). La vía de JA representa toda una maquinaria núcleo de señalización conservada que es activada por patrones de reconocimiento específico y no específico seguido del ataque del herbívoro. Las plantas pueden usar la vía JA independiente, y una paralela para crear distintos patrones de respuesta. O, específicamente, puede ser mediado a través de la activación de moduladores espacio temporales de la respuesta de JA.

### **1.3.2.2 El ácido salicílico (AS)**

Existen varios trabajos que relacionan la vía del ácido salicílico con la defensa en plantas contra ataque de artrópodos (Erb et al., 2012; Pieterse et al., 2009). Esta molécula es crucial para establecer una respuesta hipersensible local y una resistencia sistémica adquirida contra muchos patógenos de plantas (Maleck & Dietrich, 1999). El AS interfiere cuando se generan heridas al inhibir la vía octadecanoíca (Peña-Cortés et al., 1993; O'Donnell, 1996). También está relacionado con respuesta de defensa en plantas con patógenos (Klesig & Malamy, 1994). El AS media la explosión oxidativa que conduce a la muerte celular en la respuesta hipersensible, y activa los genes relacionados con patogénesis en las hojas sistémicas después de infección con patógenos avirulentos. También está implicado en el

control de sistema de defensa contra otros estreses. Kohler et al. (2002) al infectar tomate con *Pseudomonas syringae pv tomato* indujeron la acumulación de AS endógeno y el aumento de la expresión inducida por herida de fenilalanina amonio liasa. Este trabajo indica que hay un aumento de AS en respuesta de algunos genes responsables de herida después de una herida.

#### **1.3.2.3 El ácido abscísico (ABA)**

Son varias hormonas que se expresan en las interacciones planta-insecto. En estudios con maíz, los niveles de ABA se incrementan durante el ataque del gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera virgifera*) herbívoro especialista, pero no por daño mecánico (Erb et al., 2009; 2012) y, en *Arabidopsis*, después de inducir con herida y secreciones orales de *Schistocerca gregaria*, un herbívoro generalista (Schafer et al., 2011). Los niveles de ABA también se incrementan en la planta *Solidago altissima* después de inducida por el gusano cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*). La síntesis de ABA y la señalización afectan los niveles de JA y la síntesis de JA en *Arabidopsis* inducida por el herbívoro (Adie et al., 2007; Bodenhausen & Reymond, 2007). ABA y JA sinergísticamente inducen MYC2, dependiente de expresión de genes durante la respuesta a herida. MYC2 codifica un factor de transcripción nuclear básico tipo hélice-bucle-hélice que actúa como activador y represor de expresión de genes mediados por JA y sirve como un punto de integración entre señalización ABA y JA (Anderson et al., 2004; Dombrecht et al., 2007). ABA y JA están altamente interconectados y la regulación de los niveles de ABA en respuesta a la herbivoría puede modular respuesta de defensa impulsada por JA. Pero ABA es una importante señal para la respuesta a desecación, lo cual es un efecto que acompaña al ataque de herbívoros.

#### **1.3.2.4 Las auxinas (AIA)**

Los niveles de la auxina ácido indol 3-acético (AIA) se elevan en plantas atacadas por insectos (Tooker & De Morales, 2011; Mapes & Davies, 2001). En cambio en tabaco (*Nicotiana attenuata*) los niveles de AIA en las hojas se reducen entre los tres días después

de una simulación por herbívoros (Onkokesung et al., 2010). Los tratamientos con auxina sintética directamente suprimen la respuesta de defensa inducida por AS (Wang et al., 2007), la cual puede estar ligada a resistencia, mediada por AS, a insectos que se alimentan del floema (Li et al., 2006). Existe una interacción molecular en la señalización de auxinas y JA. Por ejemplo, en *Arabidopsis* la formación de auxina en raíz, es aumentada por inducción mediada por JA de genes involucrados en síntesis de auxina y transporte (Dombrecht, 2007; Sun, 2009). En hojas de *N. attenuata*, JA regula negativamente la herida inducida por disminución en el contenido de auxina (Onkokesung et al., 2010), demostrando que el efecto de JA sobre la biosíntesis de auxina son tejido específico y, probablemente, especie específica (Pauwels et al., 2009).

#### **1.3.2.5 Las giberelinas (GB)**

En estudios que alteran la señalización de GB se sugiere un papel en la inducción a la respuesta de defensa a herbívoros. Las proteínas DELLA son reguladoras transcripcionales negativos, al inducir expresión de genes del ácido giberélico (AG) y son consideradas de tener un papel clave en integrar respuestas de plantas a diversos estímulos del desarrollo y del ambiente (Grant & Jones, 2009). AGs afecta señalización de JA a través de la unión competitiva de DELLAs a proteínas JAZ, evitando de este modo la interacción JAZ-MYC2 y promoviendo la respuesta transcripcional inducida por MYC2 (Hou et al., 2010). La percepción de AG conduce a la degradación de DELLAs, llevando estas a la inhibición de MYC2 y la disminución en la respuesta de JA. De tal manera, la alteración de los niveles de DELLA afecta la biosíntesis de JA y señalización (Navarro et al., 2008; Cheng et al., 2009).

#### **1.3.2.6 Las citoquininas (CQ)**

En *N. attenuata*, transcriptos relacionados a CQ están entre los genes mas fuertemente regulados por promotores de “fatty acid-amino acid elicitation” (FAC) (Hui et al., 2003; Gilardoni et al., 2010), sugiriendo que CQ tiene un papel en la regulación de la red hormonal. Insectos deformadores de agalla y algunos minadores modulan los niveles de CQ en plantas, presumiblemente para mantener el estado de succión del tejido infectado (Girón



et al., 2007). Existe evidencia que CQ tiene un papel importante en la activación de la biosíntesis de JA. En tabaco transgénico (*N. tabacum* cv. Xanthi nc) que sobre expresa una pequeña proteína de unión a GTP, acumula altos niveles de CQ, resultando en incremento en la producción de JA después de la herida (Sano et al., 1996). Los tratamientos de CQ en hojas de híbridos del álamo (*Populus* sp.) aumentan la producción de JA inducido por herida y la expresión de genes involucrados en síntesis de JA (Dervinis et al., 2010). Las CQ modulan las defensas inducidas por herbívoro, el estado de CQ de un tejido dado puede determinar la intensidad de la respuesta de defensa de ese tejido particular después de la percepción del herbívoro y contribuye a la respuesta tejido específica en señalización inducido por herbivoría (Ballare, 2011).

#### **1.3.2.7 Los brasinoesteroides (BR)**

Los BRs antagonizan la densidad de tricomas mediado por JA y la acumulación de metabolitos de defensa en tomate (Campos et al., 2009). Los BRs reprimen la inhibición de crecimiento de raíz gobernada por JA. Los BRs son percibidos por BR insensible 1 (BRI1), un receptor con repeticiones ricas en leucina como quinasa (Kinoshita et al., 2005). BRI1 asociado a quinasa 1 (BAK1) interactúa con BRI1 y juega un papel esencial en la señalización de BR (Vert, 2008). El silenciamiento de BAK1 en *N. attenuata* reduce la herida, el JA inducido por herbívoros y los niveles de JA-Ile. Además el JA induce la actividad de inhibidor de proteinasa tripsina (IPT) (Yang et al., 2011).

### **1.3.3 Respuestas de defensa directas**

#### **1.3.3.1 Metabolitos secundarios**

Es probable que todas las plantas presenten acumulación constitutiva o inducida de metabolitos secundarios tóxicos como parte de su defensa contra la herbivoría. Muchos terpenoides, la clase metabólicamente más diversa de metabolitos secundarios de plantas (más de 40.000 estructuras conocidas), juegan un importante papel en defensa (Aharoni et al., 2005). Los alcaloides, metabolitos secundarios ampliamente distribuidos, mejor

conocidos por sus efectos metabólicos en mamíferos (cafeína, nicotina, morfina, estricnina, cocaína), probablemente evolucionaron como defensa contra insectos herbívoros. Otra clase de metabolitos secundarios de plantas bien estudiados con propiedades defensivas incluye a las furanocumarinas, cardenolidas, taninos, saponinas, glucosinolatos y glucósidos cianogénicos. Un ejemplo de estos, fue el descubrimiento de las cinco enzimas involucradas en la biosíntesis de 2,4-dihidroxi-1,4- benzoxazin-3-uno (DIBOA), una toxina encontrada en maíz, trigo y otras gramíneas (Frey et al., 1997). También han sido identificados casi todos los genes requeridos para la producción de glucosinolatos, una clase diversa de metabolitos encontrados en *A. thaliana* y otras Brassicaceae (Halkier & Gershenzon, 2006).

### **1.3.3.2 Proteínas de defensa**

Las plantas también cuentan con unas proteínas defensivas, las cuales son enzimas que se caracterizan porque unas rompen el aparato digestivo del insecto y otras impiden la degradación de las proteínas. Proteasas o enzimas proteolíticas son aquellas que catalizan el clivado hidrolítico de uniones péptido específicas en sus proteínas blanco. Estas enzimas están distribuidas en casi todos los organismos (Joanitti et al., 2006; Mosolov & Valueva, 2005) y juegan un papel clave en muchos procesos biológicos. Los eventos proteolíticos que catalizan esas enzimas sirven como mediador de iniciación de señal, transmisión y terminación en muchos eventos celulares como inflamación, apoptosis, coagulación de sangre y vías del procesamiento de las hormonas (Ivanov et al., 2006). En las plantas los IPs son proteínas pequeñas que ocurren en los tejidos de almacenamiento, como tubérculos y semillas, pero también han sido establecidos en la parte aérea de la planta (De Leo et al., 2002). Se inducen en plantas en respuesta al ataque de insectos o patógenos (Ryan, 1990). Los miembros de la familia de enzimas cisteína proteasas, por ejemplo, rompen la membrana peritrófica rica en quitina que protege el epitelio del intestino (Mohan et al., 2006). Las lectinas y quitinasas de plantas pueden tener como blanco los componentes del intestino del insecto que contienen carbohidratos (Lawrence & Novak, 2006; Peumans & Vandamme, 1995).

### 1.3.4 Compuestos volátiles como mediadores de defensas

Una de las repuestas de las plantas a la herbivoría mejor estudiadas es la elevada liberación de compuestos volátiles, las cuales incluyen terpenos, volátiles de hojas verdes, etileno, entre otros. La emisión de volátiles puede proveer un beneficio defensivo directo disuadiendo una consiguiente oviposición (De Moraes et al., 2001) o produciendo un beneficio indirecto al atraer depredadores (Kessler & Baldwin, 2001). Las plantas, por ejemplo, de forma directa responden mediante la vía octadecanoica, con el JA como molécula central en la señalización (Creelman & Mullet, 1997; Wasternack & Parthier, 1997). En contraste, en un gran número de especies de plantas que responden a la herbivoría con incremento de emisión de compuestos orgánicos, éstos atraen artrópodos carnívoros, funcionando como un mecanismo de defensa indirecto (Pichersky & Gershenzon, 2002; Arimura et al., 2005). Varios estudios sugieren que las plantas pueden percibir señales volátiles, como se evidencia por cambios en la transcripción de genes relacionados con defensa (Gomi et al., 2003; Paschold et al., 2006).

### 1.3.5 Estudios moleculares de la interacción planta-ácaro

El genoma completo (90 megabases) del ácaro *Tetranychus urticae* ha sido recientemente secuenciado (Grbic et al. 2011), siendo uno de los artrópodos herbívoros más polípagos al alimentarse de mas de 1.100 plantas de 140 familias distintas. Son varias las características biológicas de estos ácaros que los hacen adaptarse fácilmente, en especial, su gran habilidad para desarrollar resistencia a insecticidas, rápido desarrollo, alta fecundidad y determinación del sexo haplo-diploide. Aunque el genoma del ácaro verde no se encuentra secuenciado, el de *T. urticae* puede ser usado como referencia para el estudio de este organismo, debido a su cercanía filogenética. Al igual que *T. urticae*, el ácaro verde (*M. tanajoa*) pertenece al grupo Chelicerata. Los ácaros se caracterizan por exhibir una gran variación en el estilo de vida, un amplio rango de parasitismo para alimentarse de las plantas. El ácaro rojo es una plaga agrícola cosmopolita con habilidad para producir tela-araña, la cual usa para establecer un micro hábitat para la colonia, además sirve para

proteger contra agentes abióticos, depredadores y como vía comunicativa de feromonas y un vehículo para dispersión. Este ácaro es uno de los artrópodos polífagos, la cual se alimenta de más de 1.100 especies de plantas de 140 diferentes familias de plantas. Mientras que el ácaro verde es monófago, se alimenta de la familia euforbiácea especialmente del género *Manihot*. Siendo las plagas que más afectan plantas en invernadero como: tomate, pimentón, maíz, soya, manzana y cítricos. Este ácaro rojo tiene una gran habilidad para desarrollar resistencia a acaricidas e insecticidas. Estos tipos de ácaros se caracterizan por generar resistencia múltiple, sin conocerse las bases genéticas de dicha resistencia. El genoma del ácaro rojo cuando se compara con el genoma de insectos y de crustáceos presenta atributos únicos. El genoma de este ácaro fue secuenciada mediante el método Sanger cubriendo 89,6 megabases (Mb). Se generaron 70.778 secuencias expresadas (“EST: expressed sequence tag”) generadas de sus estados de desarrollo (embrión, larva, ninfas y adultos). La anotación completa del genoma es viable en el sitio web BOGAS.

#### **1.4 Las tecnologías ómicas en yuca**

Las tecnologías de microarreglos y el secuenciamiento de próxima generación fueron ampliamente usadas durante la década pasada para generar los transcriptomas de cultivos e investigar la respuesta molecular a diferentes tipos de estrés. Hoy con las últimas tecnologías se puede acceder a estudios de diversidad de secuencias de genes al poder evaluar cultivos de especies que han sido secuenciados y no secuenciados mediante ontología de genes. Datos de expresión de genes por sí solo no revelan la plena complejidad de la respuesta molecular a la perturbación. Además el control a nivel transcripcional, transduccional y modificaciones de proteína son importantes mecanismos de regulación que controlan la intensidad y especificidad de la respuesta de plantas a la perturbación (Vanderschuren et al., 2013). Es por esto que los análisis de proteómica son también necesarios. James (1997), acuñó en 1990 el término proteómica como la descripción de proteínas en un organismo, la caracterización de proteínas a nivel de modulación y modificaciones en respuesta a perturbación. Durante su inicio los análisis proteómicos tuvieron un enfoque cualitativo en donde se describieron perfiles de proteínas de diversos

tejidos y orgánelas usando electroforesis con geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2-D PAGE). Después con el desarrollo la espectrometría de masas y análisis de alto rendimiento se posibilitó también la cuantificación de las proteínas.

Con la reciente secuenciación del genoma de yuca ([www.phytozome.net/cassava](http://www.phytozome.net/cassava), DOE JGI) se abre la posibilidad de implementar la metodología de cuantificación de proteína sin marcaje (Gstaiger & Aebersold, 2009) que permite un análisis rápido de muestras de proteína a relativamente bajo costo. La cuantificación de proteínas sin necesidad de marcaje ha sido usada con éxito para investigar la modulación del proteoma en el análisis de pudrición de raíz en yuca. En un estudio se detectaron 8.960 proteínas de las cuales el 10% presenta una modulación significativa durante la evaluación al deterioro fisiológico poscosecha (Vanderschuren et al., 2014). El análisis de PCR en tiempo real (qPCR) fue usado para confirmar la regulación transcripcional de varias proteínas claves involucradas en estreses abióticos y una selección de genes presentaron una expresión diferencial entre cultivares susceptibles y resistentes según la tesis doctoral (Owiti, 2009; Owiti et al., 2008). Con la ayuda de todas estas tecnologías es posible que la comunidad científica solucione otros problemas asociados con la producción de yuca (enfermedades por virus y bacterias, sequía, etc.) (Fregene et al., 2006; Contreras Nieto & López, 2008) como también el de plagas como el ácaro verde.

## **1.5 Proteómica**

Por naturaleza los proteomas son grandes y complejos, un gen simple puede dar múltiple alternativas de proteínas debido al “splicing” alternativo, polimorfismo en la secuencia y modificaciones post-transduccionales. El principio básico del análisis proteómico consisten en la separación de proteínas vía electroforesis de gel en una o dos dimensiones de poliacrilamida (PAGE), luego las proteínas son digeridas dentro del gel y la extracción de péptidos mediante análisis de espectrometría de masas. Técnicas basadas en la no separación de proteínas mediante geles han sido desarrolladas para hacer análisis de muestras proteómicas complejas, llamados experimentos “shotgun”, en los cuales proteomas completos son digeridos sin una separación previa de proteínas. Los péptidos

son separados mediante cromatografías de fuerte cambio de cationes (SCX), seguidas de un análisis de LC-MS/MS en fase reversa (Washburn et al., 2001).

Mucho de los trabajos proteómicos fueron desarrollados primero en especies de plantas modelo, analizando perfiles de proteomas, cuantificación de proteínas, interacciones proteína-proteínas y modificación post-transduccionales (Baginsky, 2009), además la proteómica ha sido usada para investigar dinámica de proteínas en plantas en respuesta a estreses biótico y abióticos. En el inicio varios trabajos fueron desarrollados en la identificación de proteínas de diferentes tejidos y órganos de *Arabidopsis* y arroz (Komatsu et al., 1993; Kamo et al., 1995). La estrategia basada en espectrometría de masas, empezó a ser utilizada en los 90s. Por naturaleza, los proteomas son muy grandes y se caracterizan por ser bien complejos. Por ejemplo, un simple gen puede generar múltiples y distintas proteínas debido a una serie de eventos como: empalmes alternativos, polimorfismos en la secuencia y modificaciones post-transduccionales. También existen técnicas basadas en experimentos “shotgun” (de secuenciación aleatoria), en donde todo el proteoma es digerido sin separación de proteínas. Los péptidos generados son separados por fuertes cambios de carga. Luego se analizan por LC- MS/MS en fase reversa. Otras metodologías incorporan al experimento “shotgun” un etiquetado, que puede ser mediante isótopos estables por aminoácidos en cultivos celulares (SILAC) (Ong et al., 2002), dilución de isótopos (Fairwell et al., 1970), péptidos marcados con isótopos estables (Kuhn et al., 2004), radiomarcaje de aminoácidos (Sirlin, 1958), estándares de péptidos sintetizados químicamente (Gerber et al., 2003), etiquetas de masas en tándem (TMT) (Gygi et al., 1999), y últimamente, etiquetas isobáricas para cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ) (Ross et al., 2004).

Los primeros trabajos proteómicos se basaron en geles de dos dimensiones y tecnología shotgun para identificar y cuantificar proteínas, al incorporar en la década de los 80 inmovilización mediante gradiente de pH se mejoró considerablemente la separación a través de geles de dos dimensiones (2-D PAGE), facilitando la comparación directa de perfiles de proteína entre las muestras (Rabilloud & Lelong, 2011). Los geles de dos dimensiones tienen ciertas restricciones relacionadas con sensibilidad, linealidad y

homogeneidad del procedimiento de tinción y su compatibilidad con espectrometría de masas. En *Arabidopsis thaliana* se identificaron mediante 2-D PAGE 6.000 puntos de posibles proteínas; de éstas 2.943 usando espectrometría de masas para 663 genes diferentes (Giavalisco et al., 2005). En arroz empleando un análisis combinado de 2-D PAGE y HPLC espectrometría de masas (MS/MS) se identificaron 2.528 proteínas únicas (Koller et al., 2002). Otros trabajos usando 2-D PAGE fueron enfocados en caracterizar proteoma de organelas (Friso et al., 2004; Bae et al., 2003) y trabajos relacionados con compartimentalización subcelular (Chivasa et al., 2002).

Otro tipo de análisis que puede hacerse mediante la proteómica son las modificaciones post-transduccionales de proteínas reguladas y con función importante en un proceso. La fosforilación de proteínas en plantas como *Arabidopsis* y arroz han sido estudiadas mediante el análisis fosfoproteómicos a gran escala y la modulación de su fosfoproteoma evaluando varias condiciones (Rampitsch & Bykova, 2012). También se han estudiado péptidos mediante la identificación de péptidos fosforilados diferencialmente para características de interés. Los estudios de proteómica cuantitativa se pueden dividir en el uso de etiquetado con isótopos estable y técnicas sin marcaje. Las primeras involucran la modificación de los péptidos con marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) (Ross et al., 2004), este tipo de estrategias con etiquetado requiere de costosas etiquetas de isótopos, uso de “software” específicos y experiencia en análisis de datos. El número de muestras analizadas en un experimento es limitado y no todas las muestras pueden ser etiquetadas. Las segundas no necesitan ningún tipo de marcaje.

### **1.5.1 Cuantificación de proteínas sin usar marcaje, espectrometría de masas (“Label-Free MS”)**

Esta técnica se basa en el conteo espectral o la intensidad iónica de precursores peptídicos obtenidos por espectrometría de masas. Parte de la asunción que el rango al cual el ión precursor peptídico es seleccionado por fragmentación en un espectrómetro de masas está correlacionado con su abundancia. En la cuantificación relativa de proteínas, el conteo espectral son los promedios dentro de un índice de abundancia de proteína. Además, el

método se fundamenta en ciertos parámetros como la masa exacta, el tiempo de vuelo y la construcción sobre el alineamiento de los espectros de masa a alta presión. Los péptidos son identificados de acuerdo a diferentes corridas de cromatografía líquida basado sobre su tiempo coordinado de retención específico y valores precisos de carga de masa ( $m/z$ ), los cuales permiten la cuantificación de todos los péptidos detectados de una muestra biológica que están dentro del rango de sensibilidad de un analizador de espectrometría de masas. Esta metodología se caracteriza por ser muy económica, puede aplicarse a cualquier material biológico y se obtiene una cobertura de proteoma alta, porque cada proteína que es identificada por uno o más espectros de péptido puede ser cuantificada. El método sin marcaje tiene varias características como una alta profundidad analítica y un rango dinámico alto, generando una ventaja cuando se trata de proteínas grandes.

### **1.5.2 Bioinformática**

En los trabajos de proteómica es necesario conocer las bases de datos de proteínas, en donde se encuentran información relacionada con los espectros de diferentes péptidos y proteínas, la cual puede ser usada para comparar con los datos generados en un experimento. A continuación se habla de las bases de datos primarias y secundarias de secuencias de proteínas las cuales ofrecen información clave para la identificación de proteínas.

#### **1.5.2.1 Bases de datos primarias de secuencias de proteínas**

PIR (“Protein Sequence Database”): fue desarrollada por la Fundación Nacional de Estados Unidos para la Investigación Biomédica (NBRF, National Biomedical Research Foundation). En la actualidad, PIR mantiene la base de datos de secuencias de proteínas PSD (PSD, Protein 36 Sequence Database) que contiene alrededor de 283.000 secuencias de un rango taxonómico amplio. También mantiene el NREF (del inglés, “Non-redundant Reference Database”) una base de datos con más de 1.000.000 secuencias de proteínas e iProclass, otra base de datos de familias de proteínas con información sobre estructura y función (Wu et al., 2003).



MIPS (Munich Information Center for Protein Sequence): recoge y analiza datos de secuencia de numerosas fuentes. Actualmente mantiene: (1) PEDANT una base de datos que analiza secuencias de muchos genomas de eucariotas (entre ellos ratón y humanos), (2) MYGD (del inglés, “MIPS Yeast Genome Database”) base de datos para el genoma de levaduras (3) MATD (del inglés, MIPS *Arabidopsis thaliana* Database) encargada de procesar las secuencias del genoma secuenciado de este organismo y (4) MEST con herramientas de informática para hacer agrupaciones (“clusters”) de ESTs de humanos.

SWISS-PROT: proporciona información de secuencias de alto nivel, incluyendo descripciones de la función de la proteína y de la estructura de sus dominios, modificaciones post-transduccionales, etc. La base de datos *TrEMBL* fue creada como un suplemento de SWISSPROT, contiene traducciones de todas las secuencias codificantes del EMBL y está dividida en SP-TrEMBL (contiene registros que serán incorporados a SWISS-PROT) y REMTrEMBL (con secuencias que no van a ser almacenadas en SWISS-PROT) (<http://us.expasy.org/sprot/>). Buscando solucionar el gran problema de proliferación de bases de datos primarias se pensó en construir unas que reunieran varias de ellas y que se denominaron bases de datos compuestas. Entre ellas:

A. MIPSX, producida en el Instituto Max-Planck que contiene secuencias de diferentes fuentes (MIPS, PIR, SWISS37 PROT).

B. SWISS-PROT+TrEMBL, esta es considerada la mejor base de datos de proteínas en el mundo, viene de la combinación de dos bases de datos primarias, contiene baja redundancia y brinda información de alto nivel.

C. NRDB (del inglés, Non-Redundant Data Base) está construida como parte del NCBI, es la plataforma sobre la cual se realizan las búsquedas de similitud en el GenBank. Ésta es también exhaustiva y contiene información actualizada.

### **1.5.2.2 Bases de datos secundarias**

Son el producto del análisis de las bases de datos primarias y compuestas. SWISS-PROT se ha radicado como la fuente primaria de la mayoría de bases de datos secundarias. Entre las más conocidas se encuentran: PROSITE, PRINTS, que puede caracterizar una secuencia dentro de una familia en particular de acuerdo con la presencia de varios dominios conservados. Algunos ejemplos son: ENZYME, BLOCKS y PROFILES. Un valioso recurso para la comunidad científica que trabaja en plantas lo constituye la base de datos de *TAIR* (del inglés, “The *Arabidopsis* Information Resource”) la cual contiene una variada y amplia cantidad de información sobre este organismo modelo. Incluye información funcional de genes y proteínas, familias génicas, familias de proteínas, vías metabólicas, polimorfismos de secuencia, información sobre germoplasmas y fenotipos, experimentos de expresión génica y microarreglos.

## 2. MODELO METODOLÓGICO

### 2.1 Niveles de resistencia del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*), en el germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

#### 2.1.1 Sitio de trabajo, material vegetal y ácaro verde

La parte experimental de la evaluación fenotípica del ataque del ácaro verde a yuca se desarrolló en cuartos de cría e invernadero en la Universidad del Valle, Departamento de Biología, sección de Entomología, Cali, Colombia. La parte correspondiente al análisis molecular en CIDEIM, Cali, Colombia y en el laboratorio de biotecnología del ETH, en la ciudad de Zúrich, Suiza.

Para la evaluación de la resistencia se usaron plantas *in vitro* de 6 meses de edad de 10 genotipos del germoplasma de yuca (NAT-31, CMC-40, COL-1505, PER-182, PER-335, ALT-6, ALT-12, 60444, ECU-160, ECU-72). Los genotipos fueron seleccionados en términos de su conocimiento sobre los niveles de resistencia a artrópodos plaga y se escogió el material CMC-40 usado como genotipo susceptible en trabajos desarrollados por CIAT (Tabla 1).

Tabla 1. Genotipos seleccionados para la evaluación al ataque del ácaro verde que presentan tolerancia a esta y a otras plagas en yuca.

Genotipo	Ácaro	Mosca blanca	Otras plagas	Referencias
ALT 6	<i>M. tanajoa</i>			CIAT, 2004.
ALT 12	<i>M. tanajoa</i>			CIAT, 2004.
COL 1505	-	-	-	-
ECU 72		<i>A. socialis</i> ; <i>B. tabaci</i>		Bellotti y Arias, 1981; Gómez, 2004; Carabali <i>et al.</i> , 2009; Bohórquez, 2009; Omongo <i>et al.</i> , 2012; Parsa <i>et al.</i> , 2015.
ECU 160	<i>M. tanajoa</i>			Burbano <i>et al.</i> , 2007
NAT 31 (CG 489-31)		<i>A. socialis</i>		Vargas <i>et al.</i> , 2002
PER 182	<i>M. tanajoa</i>			Boaventura <i>et al.</i> , 2006.
PER 335	<i>M. tanajoa</i>	<i>A. socialis</i>		Bellotti y Arias, 1981; Boaventura <i>et al.</i> , 2006.
60444			<i>Erinnyis ello</i>	CIAT, 2004.

### 2.1.2 Estrategia para la evaluación fenotípica

Para la evaluación del ataque del ácaro verde a yuca se diseñaron dos experimentos (I, II). En el experimento I, que consistió en ensayos a libre y no libre escogencia, se evaluó el ataque del ácaro sobre los 10 genotipos seleccionados, incluido el control negativo. En el II, se seleccionaron los cuatro mejores genotipos junto con el control negativo (material menos preferido por el ácaro verde) y se evaluaron nuevamente a libre y no libre escogencia. Los experimentos I y II se desarrollaron siguiendo la metodología de evaluación de los lóbulos de cada genotipo en cajas de Petri (Mesa *et al.*, 1987). Para el análisis proteómico se emplearon las evaluaciones a no libre escogencia. De esas evaluaciones se seleccionaron dos materiales: uno susceptible y otro resistente (contrastantes) para el análisis.

### 2.1.3 Ensayos en cuarto de cría e invernadero

Los ensayos fueron realizados bajo condiciones de invernadero ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  en promedio y humedad relativa media  $70\% \pm 5$  HR). Los ácaros verdes usados en los experimentos se obtuvieron de la colonia generada y establecida en la Universidad del Valle, donde son continuamente criados sobre plantas del genotipo de yuca *M. esculenta* CMC-40 (Fig. 1).



**Figura 1.** Cuarto de cría en donde se generó y estableció la colonia de ácaro verde, *M. tanajoa*. Bajo condiciones controladas ( $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR y 12 h de fotoperiodo).



**Figura 2.** Invernaderos para la aclimatación de plantas de yuca que venían de propagación *in vitro*.

### **2.1.3.1 Evaluación fenotípica de germoplasma de yuca**

Para la selección de materiales con niveles de resistencia, se realizaron evaluaciones fenotípicas. Los 10 materiales provenientes de rescate de embrionarios proporcionados por la Unidad de Recursos Genéticos del CIAT se multiplicaron *in vitro*. Posteriormente, se propagaron. Todos los materiales se sembraron inicialmente en bolsas plásticas, en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad del Valle (Figura 3).

#### **2.1.3.1.1 Generación de plantas *in vitro* de los 10 genotipos de yuca**

Para generar el material vegetal de yuca de los 10 genotipos escogidos para la evaluación del ataque se estableció un cuarto de propagación y conservación *in vitro* de plantas. Una vez propagadas se dejaron cuatro meses en el cuarto de crecimiento con temperatura, humedad relativa y fotoperiodo controlados ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  RH y 12 horas, respectivamente). Las plantas *in vitro* fueron llevadas al invernadero removiéndolas del frasco a una bandeja con agua y se eliminó el medio de agar con macro y micronutrientes usado. Luego fueron trasplantadas a bolsas con suelo esterilizado en relación 2:1 de abono

y tierra. En el invernadero estuvieron durante tres meses cuando alcanzaron la altura ideal para los diferentes experimentos y evaluaciones fenotípicas propuestas (Fig. 2).



**Figura 3.** Cuarto de propagación de las plantas de yuca (A. zona de preparación de medio de cultivo, B. área de propagación, C.D. cuartos de crecimiento, propagaciones, E.F. Material de yuca propagado).

#### **2.1.3.1.2 Ensayos a libre y no libre escogencia para preferencia de oviposición**

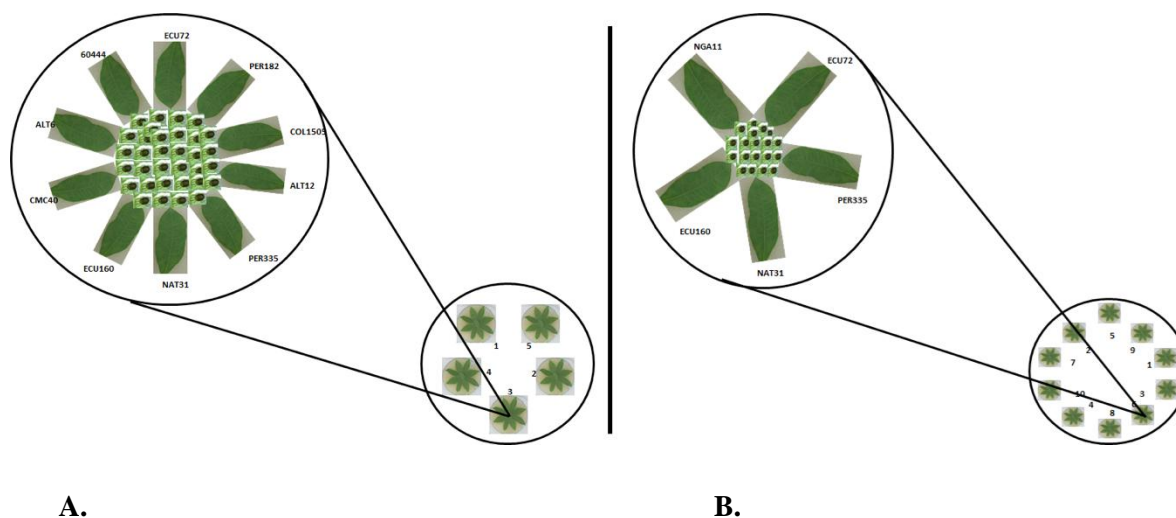
Para estimar los parámetros de preferencia y oviposición de *M. tanajoa* sobre yuca se estableció una cría del ácaro siguiendo el protocolo descrito por Mesa et al. (1987). El pie de cría fue obtenido 15 días antes del inicio del cuarto de cría por medio de colectas en cultivos de yuca en las regiones de Valle del Cauca, Quindío y Tolima. Los ácaros



colectados fueron determinados taxonómicamente y se mantuvieron en una cámara de cría en el Laboratorio de Entomología de la Universidad del Valle a  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR y 12 h de fotoperiodo (Figura 1) sobre plantas de CMC-40 (material susceptible) de *M. esculenta*.

#### 2.1.3.1.2.1 Experimento I

Con el objeto de evaluar el ataque a libre y no libre escogencia, el material susceptible CMC-40 (control) se enfrentó a los otros nueve genotipos en una caja de Petri (150mm X 15mm). Lóbulos de cada material, sobre una espuma humedecida con agua, se distribuyeron alrededor, en círculo. Al centro se pusieron 20 parejas de ácaros. El ensayo se repitió 50 veces. En el caso de no libre escogencia se ponía un solo material (e.g. 60444) y se evaluó el ataque en cada uno de los nueve materiales (lóbulos) por separado en una caja de Petri. La posición de los materiales en la caja de Petri se rotó en la dirección de las manecillas del reloj, con el fin de garantizar independencia y su distribución aleatoria como se muestra a continuación (Figura 4):

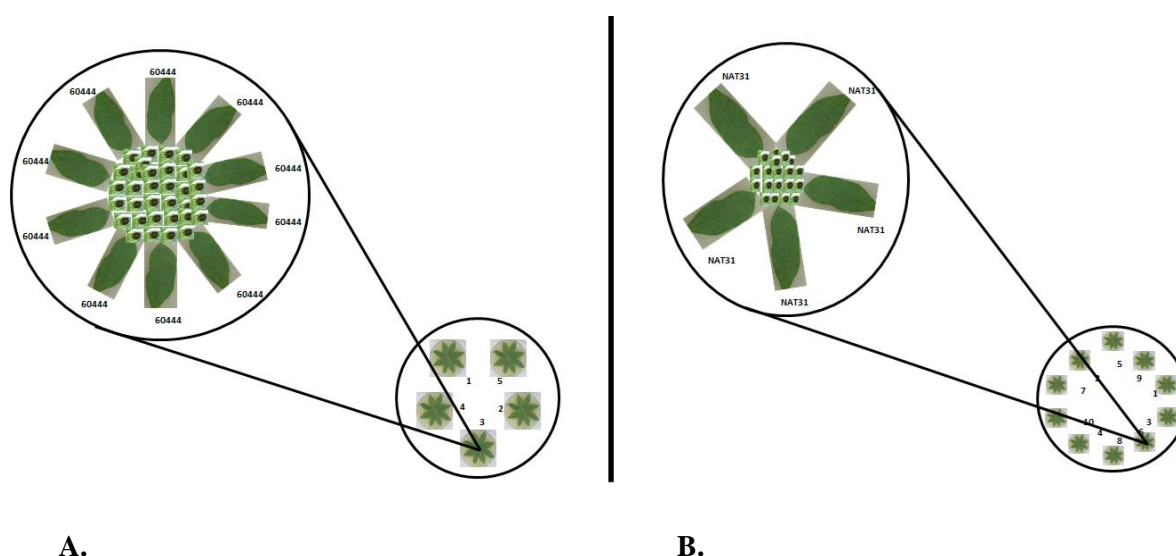


**Figura 4.** Diseño del experimento en cajas de Petri. A. Ensayo a libre escogencia, B. Ensayo a no libre escogencia en evaluación para los 10 genotipos de yuca ubicados de forma aleatoria.



### 2.1.3.1.2.2 Experimento II

En esta fase se evaluó, a libre y no libre escogencia, la oviposición sobre cada material seleccionado en el experimento anterior. En el ensayo a libre escogencia se evaluaron los cuatro materiales (NAT-31, ECU-72, ECU-160 y 60444) (lóbulos) frente al material susceptible CMC-40 (control) tal cual como en el anterior ensayo. En el caso de no libre escogencia se ponía el mismo material (ej. ECU-72), es decir se evaluó cada uno de los cinco materiales (lóbulos) por separado en una caja de Petri. En cada caja de Petri (unidad muestral) se pusieron 20 parejas de ácaros (Figura 5) en los diferentes lóbulos, se contó el número de huevos puesto por las hembras según su preferencia. En todos los casos se hicieron 50 repeticiones.

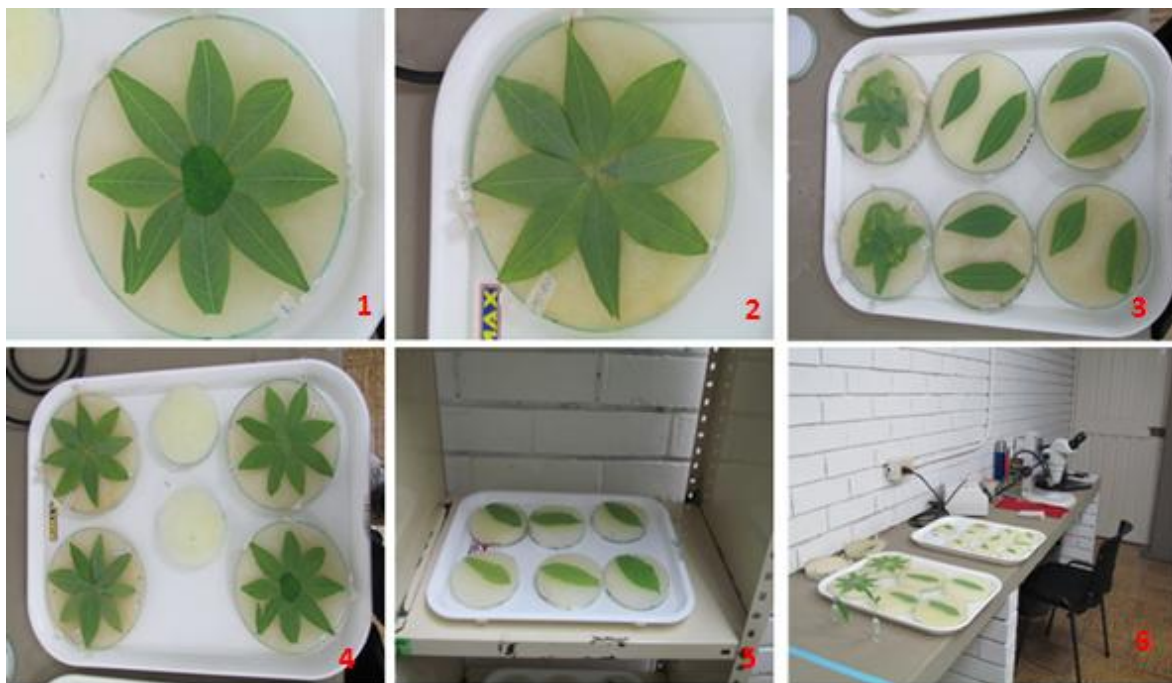


**Figura 5.** Diseño del experimento en cajas de Petri. A. Ensayo a libre escogencia, B. Ensayo a no libre escogencia para los cinco genotipos seleccionados en el experimento II.

### 2.1.3.1.2.3 Tiempos de desarrollo

En una caja de Petri (150mm x 15mm) se dispuso un lóbulo (50 lóbulos por cada genotipo) con un huevo de ácaro (cada caja representó una unidad experimental) y se hicieron

observaciones dos veces por día (09:00 y 16:00 horas) bajo un estereoscopio. En cada repetición se registró el momento de eclosión así como los cambios en los estados de desarrollo hasta adulto y su muerte (Figura 6).



**Figura 6.** Unidades experimentales utilizadas en el tiempo de desarrollo de *M. tanajoa*. 1,2. Disposición de los lóbulos sobre la caja de petrí y espuma. 3, 4. Disposición de bandejas para ubicar aleatoriamente las muestras. 5. Ubicación de las bandejas en estanterías. 6. Sitio de trabajo para la evaluación fenotípica.

### 2.1.3.2 Análisis estadístico

Diferencias entre los valores medios para las pruebas a libre y no libre escogencia fueron analizados usando análisis de varianza (ANOVA). Una prueba de Tukey Student fue usada para comparación múltiple y las medias fueron comparadas mediante in t-student utilizando el paquete estadístico *R* software desarrollado por el programa estadístico ("Development Core Team 2014"). Las diferencias entre los valores medios para preferencia de oviposición, permanencia de hospedero, rango de oviposición y tiempo de desarrollo fueron analizadas usando ANOVA de una sola vía.

## **2.2 Análisis proteómico de la respuesta direccional en la interacción yuca (*Manihot esculenta* Crantz) – ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*)**

### **2.2.1 Análisis proteómico**

#### **2.2.1.1 Estrategia para análisis “Label-Free MS”**

En el diseño experimental se tuvo en cuenta tres aspectos claves. Primero, las unidades experimentales, que en este estudio fue una y que permiten incrementar la significancia estadística al extrapolar los resultados a términos generales y tener confianza en la reproducibilidad de los resultados; la segunda el error experimental. Al mezclar (hacer agrupamientos) muestras se aumenta la precisión de las pruebas de tratamiento. Y la tercera, las réplicas técnicas. En este caso (agrupamientos de hojas de tres plantas) aumentan el poder del experimento y generan una base para establecer diferencias dentro de tratamientos.

Para el análisis “Label-Free MS” solo se tomaron y analizaron muestras de hojas de dos genotipos de yuca. Los genotipos a comparar fueron: NAT-31, según las evaluaciones fenotípicas, material altamente resistente y 60444, considerado como más susceptible cuando se comparó con CMC-40.

A continuación se presenta el diseño del experimento para los análisis transcriptómicos y proteómicos. Se tomaron muestras de hojas en nitrógeno líquido para posterior análisis molecular a partir de un experimento a no libre escogencia evaluando cinco tiempos durante la interacción del sistema yuca – ácaro verde:

Tiempos de muestreo:

**0 h** (es el tiempo en donde no hay infestación, es decir las plantas de yuca y los ácaros no están en contacto).

**6 h.** (es el tiempo en donde el ácaro verde establece el primer contacto).

**24 h** (según las evaluaciones fenotípicas, se estimó como el momento en donde hay un contacto directo entre los genotipos de yuca y el ácaro verde).

**4 días** (se considera que existe una interacción continua, en donde el ácaro se establece y empieza a colonizar la planta).

**8 días** (tiempo en donde se ha establecido la colonia del ácaro).

- El experimento solo tuvo una réplica biológica (una repetición en el tiempo).
- El experimento tuvo 4 repeticiones técnicas en los ensayos fenotípicos del ataque.
- El experimento tuvo 4 repeticiones técnicas para el análisis proteómico.

En total fueron extraídas 36 muestras de proteínas (40 condiciones, 4 réplicas) (Anexo A). Las muestras de proteína fueron procesadas de acuerdo a los protocolos FGCZ (Functional Genomic Center Zurich). Los datos de yuca generados por proteómica fueron analizados usando el genoma de referencia de yuca. Los análisis de datos fueron enfocados sobre proteínas reguladas diferencialmente (comparación entre NAT-31-resistente (4 días vs. 24h vs. 0h vs. 6h vs. 8 días) y 60444-susceptible (4 días vs. 24h vs. 0h vs. 6h vs. 8 días), NAT-31-resistente (4 días vs. 24h vs. 0h) y otras comparaciones relevantes (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tipo de muestras, tiempos y comparaciones entre tiempos.

Material	Tiempos	Respuesta	Comparaciones
NAT31	0h	Control	C vs. Temprana C vs. Tardía
NAT31	6h	Temprana	Temprana vs. Tardía
NAT31	24h		
NAT31	4 días		
NAT31	8 días	Tardía	
60444	0h	Control	C vs. Temprana C vs. Tardía
60444	6h	Temprana	Temprana vs. Tardía
60444	24h		
60444	4 días		
60444	8 días	Tardía	

### 2.2.2 Secuenciación y análisis bioinformático

Para el caso del análisis “Label-Free MS” (LTQ Orbitrap Veloz), las secuencias de aminoácidos fueron usadas para la identificación de proteínas, las cuales fueron comparadas por “tblastn” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra todos los ESTs reportados para *Manihot esculenta* en el Genbank. Para el caso de las secuencias provenientes de “Label-Free MS” (espectrometría de masas sin marcaje) fueron comparados con los EST de yuca, luego ensamblados dentro de “contigs” y “singletons” usando el CAP3 software ensamblaje de secuencia (<http://deepc2.psi.iastate.edu/aat/cap/cap.html>) y la predicción de la proteína codificada a través de una herramienta de traducción (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

### **2.2.3 Análisis “Label-Free MS”**

Para hacer el análisis de “label-free MS” es necesario extraer las proteínas totales de las muestras a ser analizadas.

#### **2.2.3.1 Extracción de proteínas**

La extracción de proteínas se realizó según protocolo establecido en el ETH (anexo B). Se extrajeron, de los diferentes genotipos de yuca, proteínas totales para ser analizadas mediante Label-Free MS. Hojas de yuca fueron maceradas con nitrógeno líquido, las proteínas totales fueron extraídas de maceración de hojas con un buffer de extracción con SDS (4% [w/v] SDS, 40 mM tris base, y 2x de EDTA libre de inhibidor de proteasa [Roche] en una relación 1:2 [w/v]). Ese extracto fue ultracentrifugado a 100.000g por 45 minutos para remover contaminantes y las proteínas fueron cuantificadas mediante ensayos de BCA (Pierce).

#### **2.2.3.2 Cuantificación de proteínas**

Es necesario cuantificar las proteínas para estimar la concentración con el fin de preparar todas las muestras a la misma concentración para los experimentos de electroforesis. Para la estimación de la concentración se hicieron ensayos colorimétricos BCA (Pierce Biotechnology, Socochim SA, Lausana) compatibles con muchos detergentes iónicos y no iónicos, que permite cuantificar entre 1 a 40µg de proteína. En el anexo C se encuentra el protocolo para la estimación de proteínas.

#### **2.2.3.3 Preparación y corrida del gel en una dimensión (1DE)**

Una electroforesis en una dimensión fue realizada en 12,5 % SDS – gel de poliacrilamida, usando el Ettan DaltII System Gel Caster (GE Healthcare, RU). En el anexo D se encuentra el protocolo para la preparación del gel y los parámetros de corrida.

#### **2.2.3.4 Fijación, tñido y desteñido de los geles**

Los geles fueron fijados y teñidos toda la noche en solución de azul de Coomassie (50% solución de Coomassie, 40% metanol). Luego fueron fijados en la solución de desteñido I (50% metanol, 10% ácido acético), dos veces durante 30 minutos con agitación. Después fijados en la solución de desteñido II (7,5% metanol, 7,5% ácido acético) todo el tiempo necesario.

#### **2.2.3.5 Escaneo de imagen del gel**

Los geles fueron escaneados en un equipo de Microtek (ScanMaker 9800 XL; TMA1600), para tener un registro de proteínas totales de las muestras.

#### **2.2.3.6 Corte de fracciones del gel**

Una vez corrido el gel se procedió a teñirlo y luego a desteñirlo para fraccionarlo en cinco partes iguales, por muestra (piezas del gel con tamaños iguales entre ellas). Cada pieza de gel fue llevada a un tubo eppendorf de 2 ml, y se siguió el protocolo como se indica en el anexo D.

#### **2.2.3.7 Digestión de proteínas**

Después de cortadas las fracciones del gel, cada trozo fue digerido usando tripsina grado secuenciación (20 µg Promega) a una concentración correspondiente a 5% de proteína por peso a 16 h a 37°C. Los péptidos para cada muestra fueron llevados a un volumen final de 50 µL (ver anexo E).

#### **2.2.3.8 Purificación de péptidos**

Después de la digestión de las proteínas las piezas del gel fueron desalificadas usando “ZipTips µ-C18”, en fase reversa. En el anexo F se encuentra el protocolo usado para la purificación de péptidos.

### **2.2.3.9 Análisis mediante espectrometría de masas**

Los péptidos fueron analizados en un equipo LTQ Orbitrap Veloz (HPLC-MS) (Fisher Scientific). Este equipo está formado por un sistema de cromatografía líquida acoplado a un chorro eléctrico (“electrospray”) e ionización “nanoelectrospray” asegurando un alto grado de automatización y rendimiento. Con el equipo se alcanzó en 0,4s una resolución de masa de 30.000 m/z. Los picos espectrales fueron seleccionados según estos criterios: rango de masa: 800 a 4.000 Da; mínima señal de ruido (S/N) para adquisición de MS/MS: 100; máximo número de picos/puntos: 8. Aquellos picos que no alcanzaron el umbral, igualmente fueron incluidos en la lista de MS/MS. La colisión de disociación inducida de los péptidos (CID) fue realizada a una energía de colisión de 1 kV y una presión de gas de colisión de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-6}$  Torr. En este método, un mínimo de 1.000 disparos (20 sub-espectro acumulado de 50 disparos de laser cada uno) y un máximo de 2.000 disparos (40 sub-espectro) fueron permitidos para cada espectro. La acumulación de disparos de laser adicionales fue detenida cuando al menos seis señales iónicas con un S/N de al menos 60 estaban presentes en el espectro MS/MS acumulado, en la región por encima m/z 200.

### **2.2.3.10 Identificación de péptidos y proteínas mediante investigación en bases de datos**

El servicio GPS (Global Proteome Server) Explorer Software (Applied Biosystems) fue usado para analizar datos adquiridos con el LTQ Orbitrap Veloz (HPLC-MS) para investigar en la base de datos. Los datos de MS y MS/MS fueron buscados usando el programa Mascot version 2.1.0 (Matrix Science, Londres, RU). Todas las búsquedas fueron eficientemente contrastadas en la base de datos Viridiplantae de UniProt (base de datos libre que contiene 495.180 secuencias de proteínas). Las siguientes opciones de búsqueda fueron usadas: máximo divisiones por mezcla: 1; máximo número de señales por espectro: 55; tolerancia de masa del péptido: 25 ppm MS/MS tolerancia: 0,2 a 0,3 Da. Las mediciones de espectrometría de masas fueron eficientes sobre un LTQ Orbitrap Veloz (HPLC-MS). El MS/MS espectro fue buscado frente una base de datos de EST de yuca



(establecido en base de datos de 2005 y que contiene 300.000 ESTs). La tolerancia de masa fue establecida a 35 ppm, con tolerancia de una división por mezcla. Las proteínas fueron identificadas de acuerdo a los criterios de significancia del programa de búsqueda.

#### **2.2.4 Análisis estadístico de datos “Label-Free MS”**

Los experimentos relacionados con proteómica cuantitativa fueron usados para analizar cambios en abundancia de proteínas en un experimento de muestras tratadas comparadas contra una condición control. El primer paso para procesar los datos fue normalizarlos para corregir errores técnicos, como en la mezcla de la muestra, diferencias en la ionización, etc. Ciertos parámetros son empleados para normalizar: recuento total de iones, número total de espectro, o el radio promedio de las proteínas más abundantes. La transformación logarítmica de los coeficientes es común para armonizar varianzas.

Siguiendo los análisis de cada reacción mediante “GPS Explorer”, el control (0h) para cada una de las muestras fue seleccionado como el denominador para calcular los cambios de perfil de cada proteína. Una proporción de uno, fue asignada al tiempo escogido como denominador en cada uno de los casos. En este sentido, una lectura fue obtenida de cada uno de los tres tiempos incluidos en cada reacción. Una combinación de análisis de secuencia bidireccional (en sentido hacia adelante y reversa) en la base de datos (Viridiplantae), con el fin de investigar y estimar los rangos en donde las proteínas pueden ser falsos positivos y el método de acuerdo a Käll et al. (2008) fue usado para calcular el rango de falsos descubiertos (FDR scores-Nivel de significancia para encontrar falsos positivos).

Las proteínas identificadas fueron mapeadas para ortólogos putativos en *Arabidopsis thaliana* (NCBI, NC\_003070.5; GI: 42592260; 04-NOV-2005) alineando cada secuencia de los ocho grupos de datos contra todas las secuencias de aminoácidos de *Arabidopsis* (Smith-Waterman, límite de significancia 1e-20-valor mínimo para encontrar similitud entre dos secuencias).

Para el análisis proteómico se hizo un análisis t student (T-test, Welch, 1947; Grossmann et al 2010) utilizando el software MeV™ (Multi experiment Viewer versión 4.4), teniendo en cuenta los siguientes parámetros: solo se consideraron genes con una proporción de expresión  $\geq 1,5$  y  $\leq -1,5$  y  $P < 0,01$ . Los valores delta ( $\delta$ ) y los resultados de progénesis para cada tiempo. Para progénesis los criterios de selección que se tuvieron en cuenta fueron:

- Un umbral de expresión (“fold-change”) para las proteínas inducidas  $>2,0$  y para las proteínas reprimidas  $<2,0$ .

- Una FDR (tasa de descubrimiento de falsos positivos, en inglés “false discovery rates”)  $<10\%$ .

El doble cambio fue calculado a partir del radio de intensidad de los iones reportados por el software orbitrap obtenidos por péptidos derivados del tiempo 0h durante la interacción (muestra de referencia) comparados a los derivados de 6h y 24h en la respuesta temprana al ataque y péptidos derivados del tiempo 0h comparados a esos derivados de 4 días y 8 días en la respuesta tardía al ataque. Usamos el corte de 2,0 veces un cambio para designar proteínas sobre-reguladas y de baja regulación. Después de esta comparación solo se consideraron como diferenciales los genes que cumplieran con los parámetros dados por los dos análisis. Se utilizara el programa “Map-Man” el cual ubica las proteínas dentro de grupos funcionales al compararlo con unas proteínas ortólogas en *Arabidopsis* mediante un análisis estadístico. La clasificación de “bins” (proteínas categorizadas en una base de datos) de “mapman” de las mejores secuencias ortólogas de *Arabidopsis* fue usada para asignar proteínas a vías específicas. El cambio promedio en la expresión de proteínas en los diferentes tiempos durante el ataque del ácaro verde, fue probado en comparación con el tiempo control y representado en un gráfico de Mapman.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Niveles de resistencia al ácaro verde, *Mononychellus tanajoa*, en el germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

##### 3.1.1 Preferencia de oviposición y rango de oviposición

Las tablas 3 y 4 resumen los resultados obtenidos de los experimentos I y II en términos de permanencia de hospedero, preferencia de oviposición y rango de oviposición. La preferencia de oviposición de *M. tanajoa* sobre los hospederos examinados estuvo en un rango de 1,5-27,1 huevos/hembra (a libre escogencia) y 1,9-12,5 huevos/hembra (sin libre escogencia) (Tabla 3). La fertilidad fue 3-4 veces más alta sobre las accesiones 60444 y CMC40. Esto fue significativamente diferente comparado con los otros materiales en los dos experimentos a libre y no libre escogencia. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ALT12, COL1505, PER182, PER335, ECU72 y ECU160.

**Tabla 3.** Permanencia de hospedero (No. hembras/día/genotipo) y preferencia de oviposición medido por No. huevos/genotipo y promedio de rango de oviposición de *M. tanajoa* sobre 10 genotipos de *M. esculenta* en una primera selección para ambos a libre (línea superior) y no-libre escogencia (línea inferior) (N=500).

Accesión	No de hembra/día/genotipo	No de huevos/genotipo	Promedio de rango de oviposición
	Media ( $\pm$ DS)	Media ( $\pm$ DS)	Media ( $\pm$ DS)
60444	2,8 $\pm$ 0,25(2-3) b	27,1 $\pm$ 1,98 (0-152) a	9,9 $\pm$ 0,27(0-44) a
	2,8 $\pm$ 0,25(2-3) f	12,5 $\pm$ 0,38 (0-154) e	4,5 $\pm$ 0,96(0-154) e
PER-335	3,5 $\pm$ 0,5(2-4) ab	17,5 $\pm$ 1,39 (0-161) ab	12,6 $\pm$ 0,3 (0-42) ab
	3,5 $\pm$ 0,5(2-4) ef	7,7 $\pm$ 0,34 (0-54) ef	2,2 $\pm$ 0,3 (0-25) ef
PER-182	3,8 $\pm$ 0,25(2-4) a	11,0 $\pm$ 0,81 (0-141) bcd	2,9 $\pm$ 0,19 (0-40) bcd
	3,8 $\pm$ 0,25(2-4) e	6,3 $\pm$ 0,53 (0-98) ef	1,7 $\pm$ 0,49 (0-86) ef
ALT-12	5,0 $\pm$ 0,0(2-5) c	13,7 $\pm$ 1,01 (0-90) b	2,74 $\pm$ 0,27(0-22) b
	5,0 $\pm$ 0,0(2-5) g	7,0 $\pm$ 0,41 (0-40) ef	1,4 $\pm$ 0,4(0-22) ef
ALT-6	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) a	3,3 $\pm$ 0,16 (0-38) cd	0,8 $\pm$ 0,005(0-14) cd
	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) e	1,9 $\pm$ 0,009 (0-21) f	0,5 $\pm$ 0,11(0-9) f
COL-1505	4,5 $\pm$ 0,3(2-5) a	12,4 $\pm$ 0,79 (0-112) bc	2,8 $\pm$ 0,34(0-51) bc
	4,5 $\pm$ 0,3(2-5) e	7,4 $\pm$ 0,5 (0-54) ef	1,6 $\pm$ 0,24(0-14) ef
ECU-160	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) a	9,2 $\pm$ 0,81 (0-153) bcd	2,3 $\pm$ 0,08(0-29) bcd
	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) e	4,0 $\pm$ 0,0 (2-4) e	1,0 $\pm$ 0,19(0-19) f
NAT-31	3,5 $\pm$ 0,5(2-4) ab	1,5 $\pm$ 0,09 (0-24) d	0,42 $\pm$ 0,03(0-9) d
	2,2 $\pm$ 0,5(2-4) ef	2,2 $\pm$ 0,12 (0-37) f	0,62 $\pm$ 0,09(0-8) f
ECU-72	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) a	12,9 $\pm$ 0,93 (0-109) bc	3,2 $\pm$ 0,31(0-30) bc
	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) e	7,0 $\pm$ 0,32 (0-140) ef	1,8 $\pm$ 0,24(0-28) ef
CMC-40	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) a	14,8 $\pm$ 1,02 (0-194) b	3,7 $\pm$ 0,14(0-30) b
	4,0 $\pm$ 0,0(2-4) e	2,2 $\pm$ 0,12 (0-37) f	0,5 $\pm$ 0,009(0-8) f

ANOVA  $P < 0,0001$ , seguido por la prueba de student-Tukey  $P < 0,05$ . (Números en paréntesis representan rangos). \*Media dentro de una columna, seguida por la misma letra, no son significativamente diferentes al 5%.

**Tabla 4.** Segunda selección de las características con los genotipos seleccionados, preferencia de oviposición y rango de oviposición (huevos/hembra/2 días) de *M. tanajoa* sobre cinco genotipos de yuca comparado con el susceptible CMC-40.

Parámetro	Libre escogencia		No libre escogencia	
Accesión	Número de huevos/genotipo y SE*	Rango de Oviposición media y SE*	Número de huevos/genotipo y SE*	Rango de Oviposición media y SE*
NAT-31	7,90 ± 0,29 (0-87) b	5,34 ± 0,99 (0-33) b	4,67 ± 0,49 (0-56) b	4,4 ± 0,28 (0-27) b
60444	31,11 ± 1,20 (0-229) a	19,12 ± 3,25 (0-108) a	14,03 ± 0,97 (0-140) a	13,34 ± 2,97 (0-103) a
PER-335	29,72 ± 1,04 (0-181) a	20,16 ± 3,67 (0-102) a	9,02 ± 0,80 (0-108) ab	7,96 ± 1,83 (0-66) ab
ECU-72	35,42 ± 1,21 (0-208) a	23,70 ± 4,3 (0-137) a	9,48 ± 0,73 (0-99) ab	7,3 ± 1,41(0-51) ab
CMC-40	29,12 ± 1,40 (0-246) a	14,92 ± 2,26 (0-66) a	7,48 ± 0,66 (0-122) ab	7,98 ± 1,69 (0-62) ab

ANOVA  $P < 0,0001$ , seguido por la prueba de Student-Tukey  $P < 0,05$ .

(Número en paréntesis representa rangos).

\*Media entre una columna, seguida por la misma letra, no son significativamente diferentes al 5%.

### 3.1.2 Rango de oviposición

En todas las plantas hospederas, las hembras de *M. tanajoa* inician la oviposición a las primeras 24h y en el cuarto día han ovipositado entre el 90 y 100% sobre los genotipos, cuando se compara con el material 60444 (Figuras 8 y 9). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos cuando se compararon con el material CMC40 ( $P < 0,05$ ). En este parámetro se puede observar la tendencia que tiene el ácaro verde sobre los genotipos de yuca, probablemente los materiales de yuca pueden presentar patrones de infestación y respuesta de defensa similares en las primeras 24h. El promedio de rango de oviposición fue significativamente diferente entre los genotipos y el material CMC40 ( $P < 0,05$ ), en el experimento I, para ensayos a libre escogencia, el material 60444 fue en el que el ácaro ovopositó más (9,9 huevos/hembra/2 días) y el más bajo sobre el material NAT31 (0,42 huevos/hembra/2 días) (Tabla 4). Para los ensayos a no libre escogencia el material con el más alto rango de oviposición fue 60444 (4,5 huevos/hembra/2 días) mientras que ALT6 fue el de más bajo (0,5 huevos/hembra/2 días). En el experimento II, en los ensayos a libre escogencia, igualmente 60444 presenta alta oviposición (19,12 huevos/hembra/2 días) y NAT31 una baja oviposición (5,34 huevos/hembra/2 días), todos estos datos están reportados en la tabla 4. Se confirma la tendencia de los materiales con los ensayos a no libre escogencia: el material 60444 presenta niveles altos (13,34 huevos/hembra/2 días) mientras que NAT31 presenta niveles bajos (4,4 huevos/hembra/2 días). Sin embargo, los rangos de alta oviposición registrados entre los genotipos fue del 35% más bajo que el 60444 (Tabla 4).

### 3.1.3 Tiempo de desarrollo y proporción de hembras

Los tiempos de desarrollo entre los genotipos y el material ECU-160 fueron significativamente diferentes, incluyendo el genotipo CMC40 ( $P < 0,05$ ) (Tabla 5). El tiempo de desarrollo (huevo-adulto) varió entre genotipos, siendo más corto sobre el material ECU160 ( $11,07 \pm 0,58$  días) y más largo sobre 60444 ( $15,10 \pm 0,28$  días) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Tiempo de desarrollo en días, y proporción de hembras *M. tanajoa* sobre genotipos de yuca. CMC40 (=susceptible)

Parámetro	Tiempo desarrollo media y SE <sup>a</sup>	Proporción de hembras <sup>a</sup>
Planta hospedera		
NAT31	13,75 ± 0,59 a	0,87 a
ALT12	14,52 ± 0,21 a	0,55 b
ALT6	14,07 ± 0,28 a	0,87 a
COL1505	14,62 ± 0,35 a	0,66 b
PER182	13,22 ± 0,40 a	0,90 a
PER335	14,52 ± 0,38 a	0,85 a
ECU72	13,35 ± 0,54 a	0,90 a
ECU160	11,07 ± 0,58 b	0,82 a
60444	15,10 ± 0,28 a	0,77 a
CMC40	14,35 ± 0,31 a	0,75 a

ANOVA  $P < 0,0001$ , seguido por la prueba Student-Tukey  $P < 0,05$ . (Numero en paréntesis representa rangos). <sup>a</sup>Media dentro de una columna, seguida por la misma letra, no es significativamente diferente al 5%.

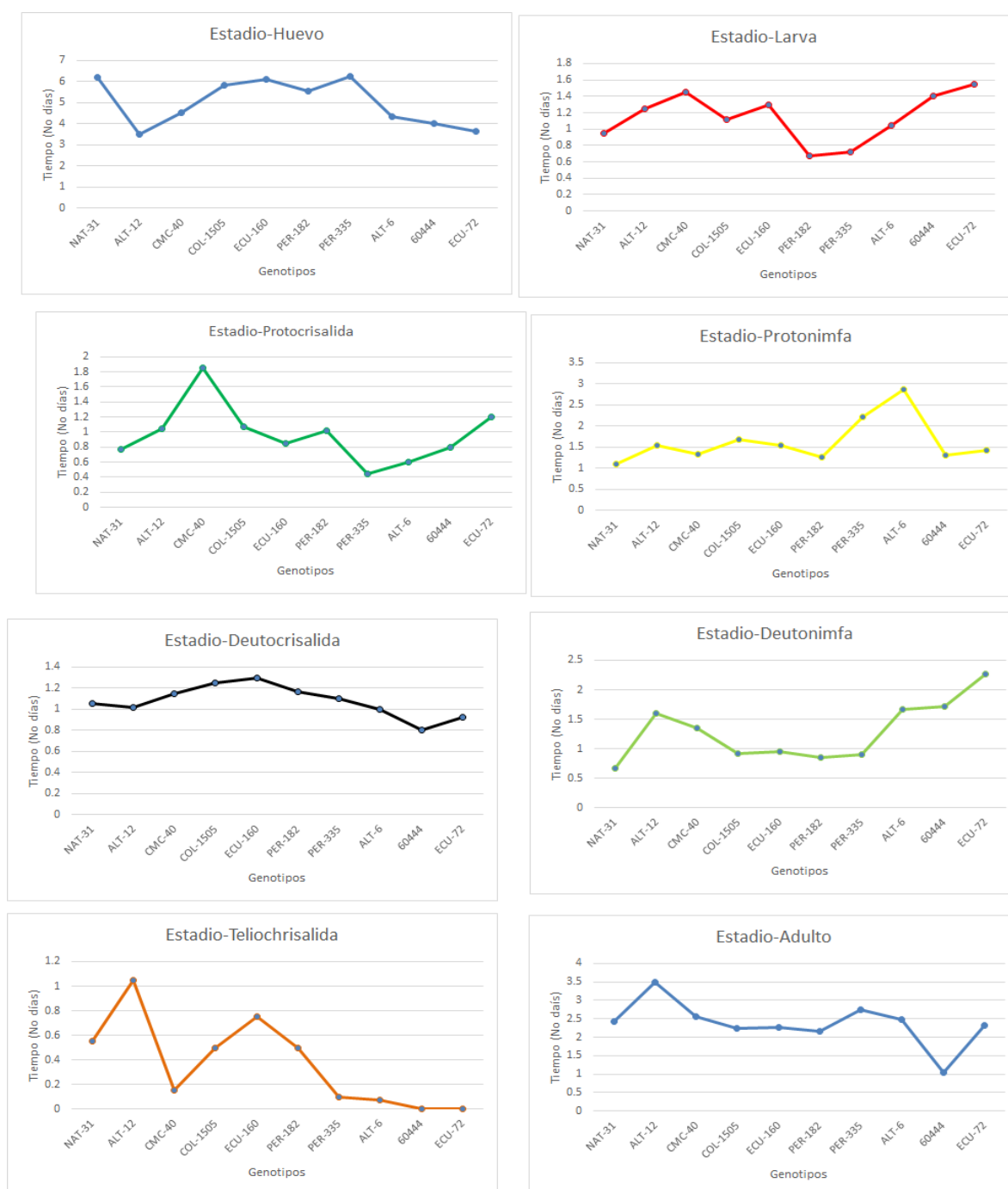
**Tabla 6.** Tiempo de desarrollo en días por estadios de *M. tanajoa* sobre genotipos de yuca y el material susceptible CMC40.

Parámetro	Huevo	Larva	Protocrisalida	Protoninfa	Deutocrisalida	Deutoninfa	Teliocrisalida	Adulto
Planta								
NAT31	6,22 ± 0,30 a	0,95 ± 0,14 abc	0,77 ± 0,07 bcd	1,10 ± 0,15 c	1,05 ± 0,11 ab	0,67 ± 0,09 d	0,55 ± 0,07 b	2,42 ± 0,25 b
ALT12	3,5 ± 0,18 c	1,25 ± 0,12 abc	1,05 ± 0,07 bc	1,55 ± 0,12 bc	1,02 ± 0,05 ab	1,60 ± 0,14 b	1,05 ± 0,06 a	3,50 ± 0,19 a
ALT6	4,32 ± 0,25 bc	1,05 ± 0,14 abc	0,60 ± 0,09 cd	2,87 ± 0,11 a	1,0 ± 0,07 ab	1,67 ± 0,09 ab	0,07 ± 0,05 c	2,47 ± 0,21 ab
COL1505	5,82 ± 0,19 a	1,12 ± 0,21 abc	1,07 ± 0,16 bc	1,67 ± 0,18 bc	1,25 ± 0,13 ab	0,92 ± 0,12 cd	0,50 ± 0,10 b	2,25 ± 0,25 b
PER182	5,57 ± 0,22 a	0,67 ± 0,08 c	1,02 ± 0,07 bc	1,27 ± 0,11 c	1,17 ± 0,10 ab	0,85 ± 0,09 cd	0,50 ± 0,07 b	2,15 ± 0,25 b
PER335	6,27 ± 0,33 a	0,72 ± 0,12 bc	0,45 ± 0,10 d	2,22 ± 0,23 ab	1,10 ± 0,14 ab	0,90 ± 0,11 cd	0,10 ± 0,05 c	2,75 ± 0,25 ab
ECU72	3,65 ± 0,13 bc	1,55 ± 0,14 a	1,20 ± 0,19 b	1,42 ± 0,09 c	0,92 ± 0,09 ab	2,27 ± 0,20 a	0,0 ± 0,0 c	2,32 ± 0,28 b
ECU160	4,0 ± 0,21 bc	1,40 ± 0,18 ab	0,80 ± 0,08 bcd	1,30 ± 0,14 c	0,80 ± 0,10 b	1,72 ± 0,23 ab	0,0 ± 0,0 c	1,05 ± 0,19 c
60444	6,12 ± 0,06 a	1,30 ± 0,14 abc	0,85 ± 0,12 bcd	1,55 ± 0,18 bc	1,30 ± 0,10 a	0,95 ± 0,09 cd	0,75 ± 0,09 ab	2,27 ± 0,18 b
CMC40	4,52 ± 0,18 b	1,45 ± 0,20 a	1,85 ± 0,16 a	1,32 ± 0,15 c	1,15 ± 0,13 ab	1,35 ± 0,14 bc	0,15 ± 0,05 c	2,55 ± 0,25 ab

ANOVA  $P < 0,0001$ , seguido por la prueba Student-Tukey  $P < 0,05$  (Número en paréntesis representa rangos). <sup>a</sup>Media dentro de una columna, seguida por la misma letra, no son significativamente diferente al 5%.

El material ECU160 difiere en tiempo de desarrollo (huevo-adulto) al compararse con los otros nueve genotipos (Figura 8), existe diferencia significativa entre los estadios de los diferentes genotipos, en el estadio de huevo el genotipo con el tiempo más corto es ALT12 (3,5 días) y los materiales con un estadio largo están NAT31 (6,22 días), COL1505 (5,82 días), PER182 (5,27 días), PER335 (6,27 días), 60444 (6,12 días). En el estadio de larva el genotipo con tiempo más corto es PER182 (0,67 días) y el más largo ECU72 (3,65 días) y CMC40 (4,52 días). En protocrisálida el tiempo más corto estuvo en PER335 (0,45 días) y el tiempo más largo CMC40 (1,85 días). Para protoninfa el tiempo más corto fue NAT31 (1,10 días) y el tiempo más largo ALT6 (2,87). En deutocrisálida el tiempo más corto fue ECU160 (0,80 días) y el tiempo más largo 60444 (1,30 días). Para el estadio deutoninfa el tiempo más corto fue NAT31 (0,67 días) y el tiempo más largo ECU72 (2,27 días). En teliocrisálida, los materiales ECU72 (0,0 días) y ECU160 (0,0 días) no presentan este estadio y el tiempo más largo es ALT12 (1,05 días). Y en adulto el tiempo más corto ECU160 (1,05 días) y el tiempo más largo ALT12 (3,5 días) (Tabla 6). Se puede decir que el material NAT31 presenta tiempos cortos en protoninfa y deutoninfa, los cuales son estadios claves en el ciclo de vida del ácaro. Los materiales ECU72 y ECU160 tienden a suprimir los estadios de quiescencia. Se podría decir que en los materiales NAT31, ECU72 y ECU160 el suprimir y tener tiempos cortos puede ser debido a un posible mecanismo que exhiben niveles de resistencia. En casi todos los genotipos la proporción de hembras no fue afectada cuando las poblaciones de *M. tanajoa* se desarrollaron sobre ellos (Tabla 5) siendo de 0,9:0,1. Es importante mencionar que las hembras son las que deciden qué huevo será macho, debido en gran parte por su condición haplo-diploide (Tabla 5).

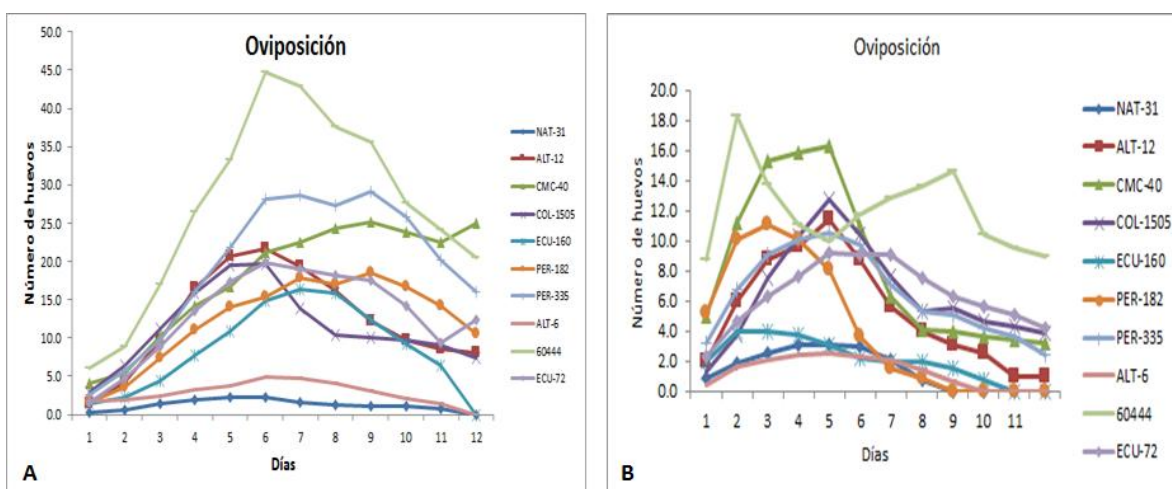




**Figura 7.** Tiempos de desarrollo para los 10 genotipos evaluados para la resistencia/tolerancia al ácaro verde.

### 3.1.4 Preferencia de oviposición/libre escogencia

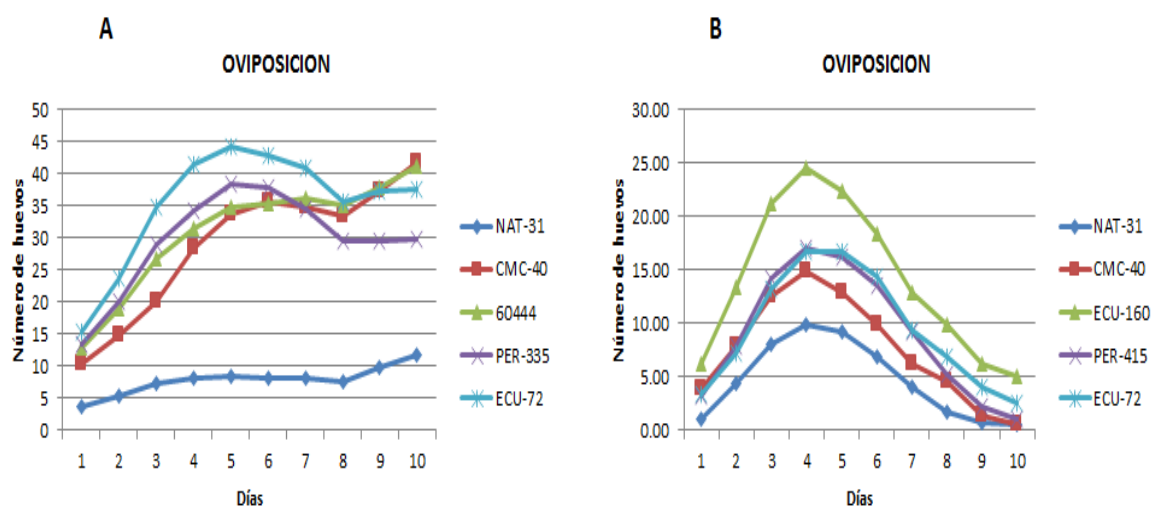
Los resultados de los ensayos a libre escogencia para preferencia de oviposición para los experimentos I y II se presentan en las figuras 8 y 9. Diferencias significativas fueron establecidas entre el número de huevos que oviposito el ácaro verde sobre los diez genotipos al ser comparados con el material susceptible (CMC40) ( $P<0,05$ ) (Figuras 8, 9). Este parámetro tiene el mismo comportamiento para el material CMC40 lo que indica una tendencia total de susceptibilidad. Para el experimento I, el rango de oviposición fue 1,5-27,1 huevo/hembra/8 días, y el experimento II fue de 7,9-35,42 huevo/hembra/8 días (Figuras 8A, 9A). En el experimento I, el genotipo 60444 (27,1 huevos) y PER335 (17,5 huevos) presentaron una alta oviposición. Los genotipos menos preferidos para oviposición por *M. tanajoa* fueron NAT31 (1,5 huevos) y ALT 6 (3,3 huevos), con 89,8% y 77,7%, respectivamente, comparados con CMC40 (14,8 huevos) (Figura 8A). Para el experimento II, la preferencia de oviposición para los genotipos 60444 (31,11 huevos) y ECU72 (35,42 huevos) presentaron la misma tendencia cuando se compara con el material CMC40 (29,12 huevos). Igualmente que en el experimento I, el material NAT31 es el menos preferido por el ácaro verde (7,90 huevos).



**Figura 8.** Preferencia de oviposición del ácaro verde en Experimento I: (A) en ensayos a libre y (B) no libre escogencia.

### 3.1.5 Preferencia de oviposición/no libre escogencia

La preferencia de oviposición en ensayos a no libre escogencia fue significativa diferente en los genotipos NAT31 y ALT6 al compararse con los resultados del genotipo susceptible (CMC40) (Figura 8) ( $P<0,05$ ). Estos dos materiales tienen la misma tendencia a la preferencia de oviposición. Para el experimento I, el rango de oviposición estuvo de 2,2-12,5 huevo/hembra/8 días, y el experimento II tuvo un rango de 4,67-14,03 huevo/hembra/8 días (Figura 8B y 9B). En el experimento I, los genotipos 60444 (12,5 huevos) y PER335 (7,7 huevos) tienen oviposición alta; sin embargo, el promedio del material 60444 tuvo una diferencia de 1,9 huevos, cuando se comparó con CMC40. Los genotipos menos preferidos fueron NAT31 (2,2 huevos) y ALT6 (1,9 huevos), con 79,2% y 82% menos preferidos para oviposición, respectivamente (Figura 8B). Para el experimento II, los genotipos 60444 (14,03 huevos) y ECU72 (9,48 huevos) presentaron una alta oviposición cuando se comparó con CMC40 (7,48 huevos) (Figura 9B). Igual que en el experimento I, NAT31 es el menos preferido por el ácaro verde (4,67 huevos).



**Figura 9.** Preferencia de oviposición del ácaro verde en Experimento II: (A) ensayos a libre y (B) no libre escogencia.

### **3.2 Análisis proteómico de la respuesta direccional en la interacción yuca (*Manihot esculenta* Crantz) – ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*)**

Las alteraciones en el proteoma de yuca durante la respuesta de defensa temprana y tardía al ataque del ácaro verde fueron monitoreadas mediante aproximaciones de geles de una dimensión (1D) y espectrometría de masas con proteínas sin marcaje (“Label free – orbitrap”). El estudio identificó nuevas proteínas reguladas durante la respuesta de defensa temprana y tardía ante el ataque del ácaro verde y también confirmó la regulación de algunas proteínas desconocidas asociadas a la interacción (Tabla 7). El estudio proteómico mediante la electroforesis en 1D y “label free-orbitrap” se utilizó para identificar y comparar proteínas que son diferencialmente reguladas entre los genotipos contrastantes (NAT31-resistente y 60444-“susceptible”) y entre la respuesta de defensa durante la interacción evaluada en 5 tiempos (0h, 6h, 24h, 4 días y 8 días).

Estas herramientas y técnicas proteómicas pueden ser efectivas para entender procesos moleculares y ayudar a comprender la complejidad de las redes de señalización en las interacciones entre yuca – ácaro verde. Las proteínas inducidas durante el ataque del ácaro verde estuvieron asociadas con el metabolismo de pared celular, biosíntesis de metabolismo secundario, respuesta de defensa a estrés biótico, regulación de estrés oxidativo y funciones metabólicas “housekeeping” (niveles básicos). Las proteínas identificadas como reprimidas estuvieron asociadas con modificación de ADN, señalización, proceso de síntesis de proteínas, entre otras (Tablas 8 y 9). Se abordará primero la descripción de forma general de las rutas y vías metabólicas, genes que fueron regulados para los dos materiales (NAT31 y 60444) durante el ataque del ácaro verde en dos tiempos de interacción; la temprana establecida a las 6h y 24h y otra tardía a los 4 y 8 días. Después se hablará de los procesos biológicos específicos que mostraron una expresión diferencial relacionados con los mecanismos de defensa en respuesta al ataque.

### 3.2.1 Análisis de cambio de proteínas durante la interacción yuca – ácaro verde

Se detectaron, aproximadamente, 5.000 – 5.500 proteínas para cada uno de los dos genotipos evaluados (NAT31 material resistente, 60444 material “susceptible”) (Datos que no se muestran, pero pueden encontrarse en: [www.pep2pro.ethz.ch](http://www.pep2pro.ethz.ch)). Vale la pena aclarar que en el tiempo (0h) la planta de yuca no está interactuando con el ácaro verde y es diferente al genotipo susceptible. Y los tiempos (6h, 24h, 4d, 8d) fueron comparados usando el programa Progenesis LCMS versión 4.0 (Nonlinear Dynamics), una herramienta desarrollada para cuantificar datos producidos por cromatografía líquida – SM sin marcaje (Grossmann et al., 2010). Progenesis básicamente genera un flujo de trabajo con el fin de comparar los datos suministrados en LC-MS para cuantificar la abundancia de las proteínas en el experimento. Es decir, hace una comparación de proteínas basado sobre su abundancia, para lo cual normaliza los péptidos calculados cuantificándolos mediante el método “top-three protein quantification” (T3PQ) (Silva et al., 2006; Grossmann et al., 2010). La información presentada en las tablas suplementarias para cada tiempo indica la regulación de las proteínas según su abundancia en cada uno de los tiempos.

Se usó la base de datos TAIR8 de anotación de ontología de genes (GO) (Berardini et al., 2004) para evaluar la distribución de las proteínas reguladas e identificadas por “Label-free-orbitrap” dentro de diferentes categorías de funciones biológicas y luego comparar los resultados con toda la anotación del genoma de *A. thaliana* para determinar cuáles categorías eran inducidas o reprimidas. El análisis reveló una inducción de proteínas con anotación funcional para proteínas de metabolismo primario, otros procesos metabólicos como el secundario, respuesta a estrés, respuesta a estímulo biótico, de tipo ataque de insectos y una represión de proteínas involucradas en procesos biológicos tales como regulación transcripcional. De forma similar, las proteínas reprimidas fueron enriquecidas (comparadas en varias bases de datos) empleando el programa PlantGSEA, ampliando esas proteínas reprimidas con categorías funcionales correspondientes a metabolismo de proteínas de *Arabidopsis*, otras respuestas celulares, respuesta a estímulo biótico, respuesta a estrés, y representadas en las categorías funcionales correspondiente a la transcripción (Tablas 7 y 8).

### **3.2.2 Proteínas reguladas a las 6hs, 24hs, 4 y 8 días después del ataque**

Todos los resultados pertenecen al experimento a no libre escogencia para los genotipos NAT31 y 60444 durante la interacción con el ácaro verde en cuatro diferentes tiempos denominados: una respuesta temprana (6h y 24h) y otros tardíos (4 y 8 días). Se identificó un total de 5.230 proteínas para el genotipo NAT31 y 5.490 para 60444.

El análisis con Progénesis reveló un total de 840 proteínas inducidas o con regulación diferencial para los dos genotipos para proteínas con valores mínimos de cambio en la regulación al compararse con el control 0h de 2,0 veces el cambio de diferencia en la regulación para las 6h, 24h, 4 días y 8 días de tiempo muestreado cuando son comparadas con el control 0h ( $p < 0,01$ ) (Tablas suplementarias 1 a 18, en estas se resumen las proteínas inducidas y reprimidas para los dos genotipos y su agrupamiento en categorías funcionales. El valor en los diferentes tiempos es la regulación de las proteínas al compararse con el control). En contraste, las proteínas reprimidas, con valor menor a 2,0 veces, fueron de 1.160 (Tablas suplementarias 1 a 18). Durante la interacción de yuca con el ácaro verde en la respuesta temprana (6 y 24h) y tardía (4 y 8 días), se encontraron aproximadamente unas 600 proteínas reguladas, de las cuales 493 en el genotipo 60444 y 107 en NAT31; mientras 556 proteínas no reguladas, de las cuales 436 de 60444 y 120 de NAT31 (Tabla 7).

Algunas de las diferencias en las proteínas entre los diferentes tiempos evaluados sólo fueron detectadas en el tiempo de 0h pero estuvieron ausentes a las 24h y fueron nuevamente detectadas a los 8 días, una posible explicación puede ser que fueron silenciadas. Las proteínas de choque térmico, alcohol deshidrogenasa, enzima málica, y una proteína hipotética fueron detectadas en el tiempo 0h, pero no se presentaron en el tiempo 24h en el gel, sugiriendo cambios cualitativos en los perfiles de proteínas, las cuales pueden contribuir al desarrollo de la respuesta de defensa.

**Tabla 7.** Proteínas inducidas y reprimidas ( $p < 0,01$ ) en los genotipos NAT31 (resistente) y 60444 (“susceptible”). El control es 0h, respuesta temprana es 6h - 24h y respuesta tardía es 4 días – 8 días.

Comparación	NAT31	60444	Ambos genotipos
<b>Proteínas inducidas</b>			
Control vs. R. temprana	38	151	3
Control vs. R. tardía	43	173	10
R. temprana vs. R. tardía	26	169	0
<b>Totales</b>	<b>107</b>	<b>493</b>	<b>13</b>
<b>Proteínas reprimidas</b>			
Control vs. R. temprana	42	27	27
Control vs. R. tardía	48	140	140
R. temprana vs. R. tardía	30	269	269
<b>Totales</b>	<b>120</b>	<b>436</b>	<b>457</b>

Proteínas seleccionadas por presentar valores mayores 2,0 veces el cambio de diferencia en la regulación.

### 3.2.3 Clasificación de proteínas dentro de rutas metabólicas

Las proteínas fueron identificadas como reguladas cuando se comparó el cambio en la regulación de las proteínas entre los diferentes tiempos evaluados (6h, 24h, 4días y 8 días) con el control 0h. Para evaluar las proteínas identificadas con el programa Progenesis, éstas se clasificaron jerárquicamente en grupos funcionales. El papel fisiológico de las proteínas que fueron significativamente inducidas o reprimidas en todos los tiempos durante el ataque del ácaro verde al compararse con el control fueron visualizadas con el software “Map-Man” (Thimm et al., 2004). Este gráfico muestra una visión general del modelo de regulación de las proteínas / enzimas que cambian durante la interacción de yuca con el ácaro verde y las vías bioquímicas a las que pertenecen (Figuras suplementarias 1 a 8).

El análisis reveló que el genotipo “susceptible” 60444 presenta una pronunciada sobre-regulación (inducción) de proteínas relacionadas con regulación de estrés biótico, de resistencia, genes de proteínas PR, vías de metabolismo secundario y regulación redox, como enzimas involucradas en degradación de proteínas. También se identificaron proteínas desconocidas. Éstas, probablemente, permitirían la identificación de proteínas nuevas relacionadas con el ataque de artrópodos plaga. En total 10.720 proteínas (confidencia fin de corte > 90 %) fueron identificadas de las cuatros réplicas técnicas (5.490 del genotipo susceptible 60444 y 5.230 del resistente NAT31) al ser buscadas en la base de datos *Viridiplantae* (que contiene 495.180 secuencias de proteínas). Debido a la redundancia en la identidad de cada proteína, se usaron ortólogos de las proteínas de *A. thaliana* para identificarlas y esto condujo a la identificación de genes ortólogos (proteínas únicas). Se identificaron algunas secuencias homólogas a proteínas que hacen parte de la respuesta a estrés biótico y abiótico. Se encontraron proteínas relacionadas con defensa de la planta al ataque de patógenos y plagas, proteínas que actúan en el reconocimiento de la plaga, otras que participan en el desarrollo de estrés oxidativo que muy probablemente activan la respuesta hipersensible (HR), otras que pueden activar vías completas de señalización como las vías de JA, ET y SA. También aquellas relacionadas con hormonas como: auxinas, brasinoesteroides y ABA. Se encontraron secuencias relacionadas con la pared celular, betaglucanasa, proteólisis, MAPKinasas, factores de transcripción, proteínas de choque térmico y metabolismo secundario. En la tabla 8, se presenta la clasificación de las proteínas por categorías funcionales inferidas por OG (ontología de genes), obtenida de la interacción y la respuesta de yuca al ataque de *M. tanajoa*, para los dos genotipos y los diferentes tiempos evaluados (6h, 24h, 4días y 8días) (Tabla 8). También se establece el número de proteínas y aquellas identificadas con el programa ProGénesis para los materiales NAT31 y 60444 con un total de 1.535 y 3.687 proteínas activas, respectivamente.

**Tabla 8.** Clasificación y número de proteínas por categorías funcionales inferidas por OG, obtenidos en respuesta de los materiales NAT31 y 60444 al ataque de *M. tanajoa*.



Proceso biológico	No proteínas en NAT31	No proteínas en 60444
Fotosíntesis	137	141
Metabolismo mayor de CHO	42	69
Metabolismo menor de CHO	7	48
Glicolisis	39	33
Fermentación	5	10
Glucogénesis/Ciclo de glioxilato	4	5
OPP	5	23
TCA/org. Transformación	4	64
Transporte mitocondrial de electrones/ATP	1	21
Pared celular	26	107
Metabolismo de lípidos	42	91
Metabolismo de nitrógeno	14	20
Metabolismo de aminoácidos	88	285
Asimilación de azufre	4	4
Metales	4	11
Metabolismo secundario	78	163
Metabolismo hormonal	40	83
Co-factor y metabolismo de vitaminas	3	18
Síntesis de tetrapirroles	8	24

<b>Estrés biótico</b>	<b>89</b>	<b>110</b>
<b>Estado redox</b>	<b>38</b>	<b>57</b>
<b>Metabolismo de poliamina</b>	<b>3</b>	<b>12</b>
<b>Metabolismo de nucleótidos</b>	<b>24</b>	<b>80</b>
<b>Biodegradación de cenobióticos</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
<b>Metabolismo de carbono</b>	<b>5</b>	<b>2</b>
<b>MISC</b>	<b>103</b>	<b>171</b>
<b>ARN</b>	<b>74</b>	<b>272</b>
<b>ADN</b>	<b>18</b>	<b>68</b>
<b>Proteínas</b>	<b>314</b>	<b>732</b>
<b>Señalización</b>	<b>35</b>	<b>101</b>
<b>Procesos celulares</b>	<b>25</b>	<b>134</b>
<b>micro ARN</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Desarrollo</b>	<b>26</b>	<b>60</b>
<b>Transporte</b>	<b>35</b>	<b>147</b>
<b>Nutrición mineral</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Genes no asignados</b>	<b>190</b>	<b>510</b>
<b>Total</b>	<b>1,535</b>	<b>3,687</b>

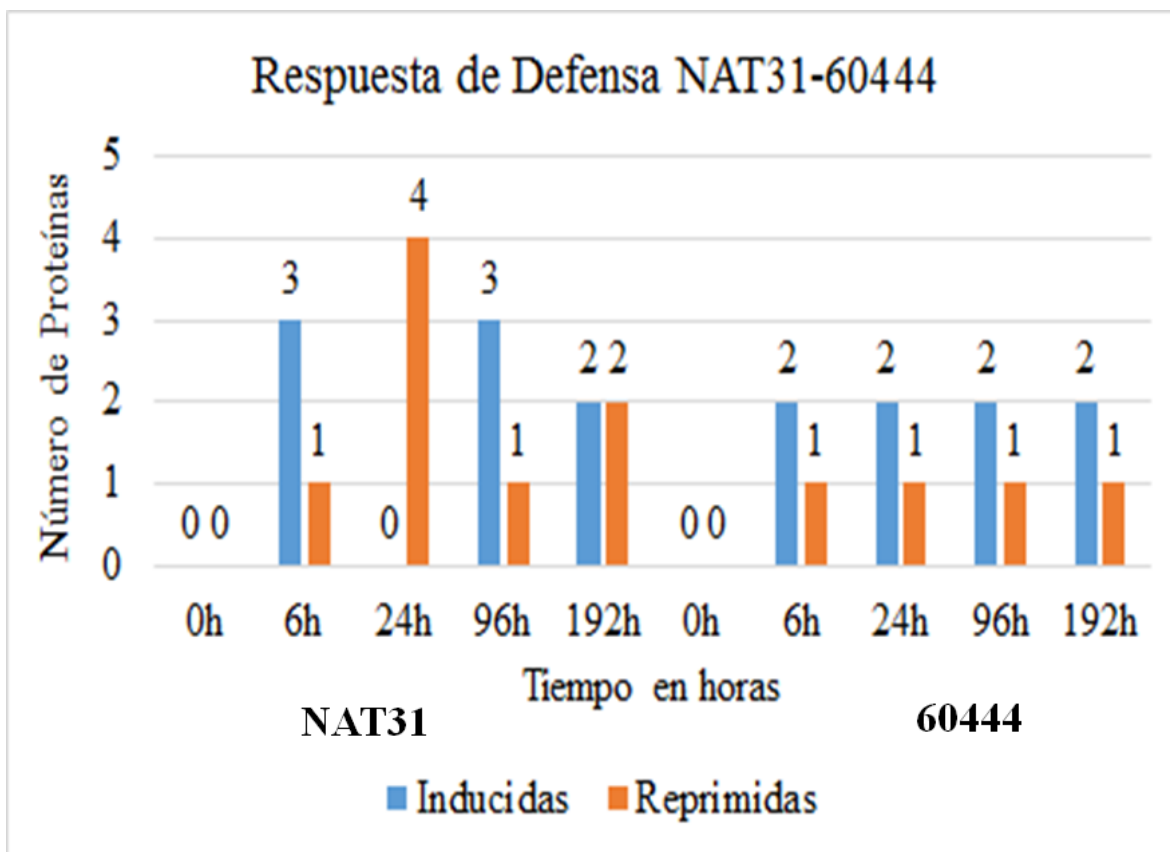
### **3.2.4 Proteínas reguladas relacionadas con estrés biótico**

Una de las vías que fuertemente se activó induciendo y reprimiendo proteínas está la relacionada con estrés biótico. Al comparar los genotipos contrastantes (NAT31 y 60444) se identificaron vías en común y otras que se diferencian durante la interacción de yuca con el ácaro verde. Se evidenció que 60444, a diferencia del NAT31, activa proteínas de reconocimiento relacionadas con explosión respiratoria, como también algunos factores de transcripción y hay diferencias en la señalización hormonal. Por el contrario el material NAT31 activa proteínas de reconocimiento relacionadas con genes R, no se activan los factores de transcripción y hay diferencias en la señalización hormonal. En cuanto a estas diferencias 60444 activa más proteínas en cada una de las hormonas (auxinas, brasinoesteroides, ABA, etilenos, SA y JA), mientras que la respuesta de NAT31 es más reducida en el número de proteínas que se inducen y reprimen. Para el caso de NAT31 en la hormona ABA hay una proteína que se induce a las 6h, 24h, 8d y se reprime a los 4d, es necesario validar estas proteínas mediante PCR en tiempo real para corroborar esto y tratar de dar una explicación, por el contrario en el material 60444 solo se induce un gen relacionado con las ABA a los 4d. En términos generales la respuesta del material NAT31 es más discreta cuando se compara con 60444. NAT31 responde al ataque del ácaro verde solo con 1-2 genes durante todos los estadios y las hormonas brasinoesteroides, ABA y JA. En cambio 60444 responde con más genes relacionados con las hormonas auxinas, etileno y jasmonato. Las vías comunes entre los dos genotipos son proteínas relacionados con defensa (proteínas PR); con pared celular, (betaglucanasa, proteólisis, estado redox, peroxidasas, glutatión S-transferasa); con señalización (MAPKinasas, proteínas de choque térmico, metabolitos secundarios) y proteínas relacionadas con estrés abiótico. Durante la evaluación fenotípica, preferencia de oviposición, el genotipo 60444 se evaluó como susceptible, pero cuando se analizó a nivel proteómico, su respuesta en cuanto a las vías que se activan no corresponde a un comportamiento susceptible, por el contrario duplica y triplica el número de proteínas para contrarrestar el ataque del ácaro si se compara con NAT31.

A continuación se abordarán los procesos biológicos en donde hubo una diferenciación a nivel de proteínas y aquellas relacionadas con defensa entre los materiales NAT31 y 60444. En las tablas suplementarias 1 a 18 se observan las proteínas que se expresan diferencialmente (inducidas o reprimidas). Se encuentra el proceso biológico implicado, la descripción de la accesión de la proteína y la diferencia en la regulación de cada proteína para los tiempos evaluados. En la categoría defensa se muestra cuáles proteínas participan en la biosíntesis o son inducidas por las vías de AS, JA, ET y ABA; y otras categorías funcionales relacionadas con defensa.

#### **3.2.4.1 Proteínas de defensa**

El reconocimiento de las plantas de yuca al momento de la alimentación de los ácaros está dado a través del uso de patrones de reconocimiento de receptores transmembranales (PRRS), o mediante nucleótidos polimórficos unidos a repeticiones ricas en leucina (NB-LRR), las cuales codifican para muchos genes R. En este estudio se identificaron proteínas de defensa, cuatro proteínas para el material NAT31 y tres para 60444, relacionados con defensa en plantas a patógenos (bacterias, hongos, virus) y a herbívoros. La proteína “disease resistance protein” (NBS-LRR class) (at3g14470) se expresa en los dos materiales, se reprime en todos los tiempos en 60444 y solamente se induce a los 4d en NAT31 (Figura 10; Tablas 9 y 10). Este tipo de proteínas son claves para entender las diferencias que presentan estos dos materiales, las cuales podrían dar explicación a la resistencia de NAT31 y la “susceptibilidad” de 60444. Es notable la diferencia entre las proteínas que se inducen en las comparaciones de los tiempos y los dos materiales así: para NAT31 se encontraron más proteínas inducidas en los tiempos 6h y 4d (5 proteínas), mientras que en el material 60444 se regularon dos proteínas durante todos los tiempos. Entre las proteínas que se inducen tenemos; para NAT31, las relacionadas con respuesta a resistencia a enfermedad, dos proteínas de resistencia a enfermedad (clase NBS-LRR) (Tabla 9), proteína de familia de resistencia a enfermedad/familia de proteína LRR. Para 60444 se encontraron; una proteína que codifica un endoquitinasa acidica, y dos genes que codifican proteínas de resistencia a enfermedades (clase NBS-LRR) (Tabla 10).



**Figura 10.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en respuesta de defensa entre los materiales NAT31 y 60444.

En las tablas suplementarias 1 y 2 para los genotipos NAT31 y 60444, respectivamente, se observa un tipo de proteína R tipo NBS\_LRR (at3g14470) la cual se regula en ambos genotipos, en 60444 se reprime durante todos los tiempos, mientras que en NAT31 lo hace a las 24h y 8d, pero se induce a las 6h y 4d. Este comportamiento es bien interesante para seguir evaluando mediante validación de genes. El resto de proteínas R para los dos genotipos es completamente diferente, lo que puede dar indicio de una respuesta específica dependiendo del genotipo. Las proteínas PR (at5g24090, at4g27220) de 60444 se inducen durante todos los tiempos indicando una respuesta inducida activa para repeler el ataque.

### **3.2.5 Activación de proteínas de defensa**

#### **3.2.5.1 Proteínas relacionadas con patogenicidad (PR)**

Varias especies de artrópodos no masticadores como los ácaros y los insectos floemófagos inducen el incremento de los niveles de proteínas PR (proteínas relacionadas con patogenicidad) en las plantas hospederas. En nuestro estudio fueron aisladas secuencias similares a un PR: *PRB1* (*CHIB1*) para el genotipo susceptible 60444 (Tabla suplementaria 2).

##### **3.2.5.1.1 Quitinasa básica (*CHIB1* o *PR-3*)**

Se encontró varias proteínas NBS-LRR, relacionadas a resistencia a enfermedades y endoquitinasas inducidas en ambos genotipos, pero más fuerte inducidas en todos los tiempos en el material 60444. Según GO estas proteínas pertenecen a la familia *glycosyl hydrolase 19* y a la subfamilia *Chitinase class I*. Implicadas en defensa contra hongos e insectos, la función es hidrolizar los enlaces (1-4)-beta-D-glucosamina de la quitina de la pared celular de hongos y la matriz peritrófica del intestino de insectos. Se ha visto implicada particularmente en resistencia a patógenos inducida por JA, tales como *A. brassicicola* en *Arabidopsis*. En este trabajo estaría atacando la matriz peritrófica del intestino del ácaro verde.

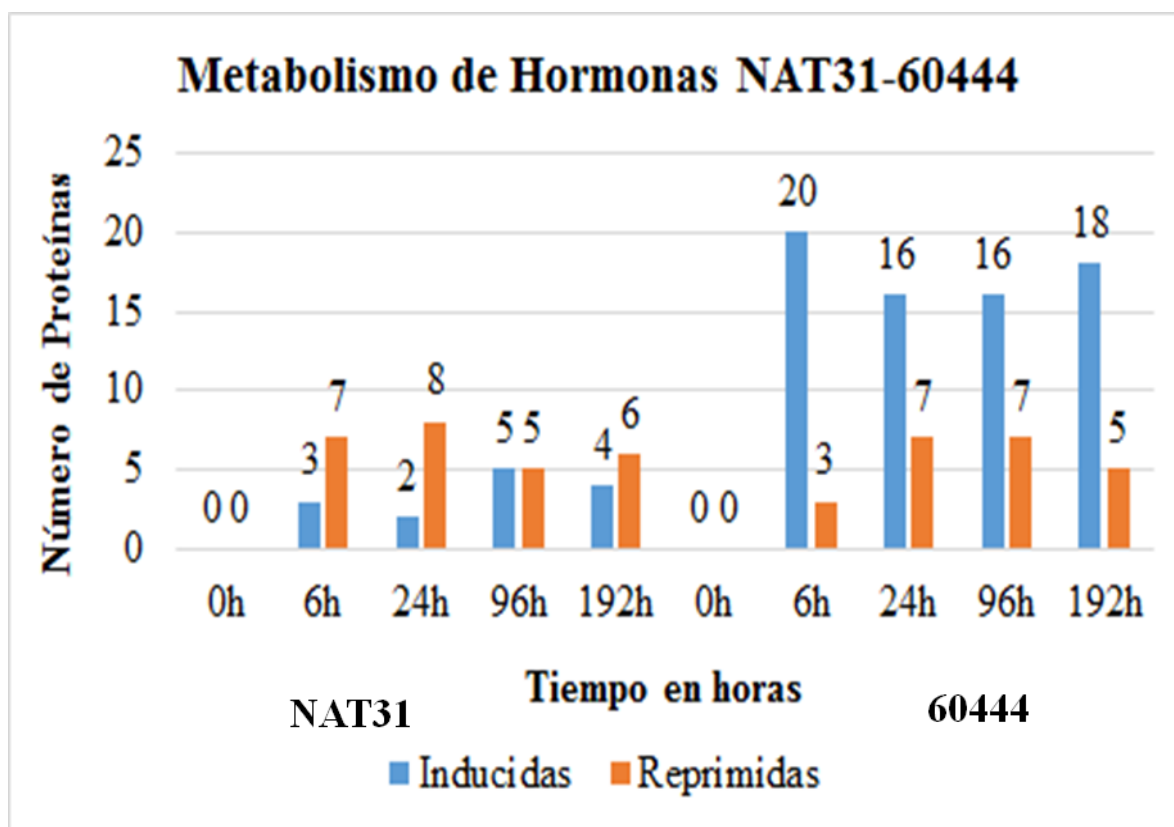
#### **3.2.5.2 Regulación de proteínas de defensa inducidos por JA, ET y SA**

En este trabajo se encontraron particularidades en las vías relacionadas con respuesta a ataque de artrópodos, acompañando la expresión de los brasinoesteroides, auxinas y ABA. Se ha demostrado que las vías metabólicas de SA, JA y ET tienen un importante papel en respuestas de defensa para estreses bióticos en plantas (Kessler & Baldwin, 2002; Rojo et al., 2003; Chen et al., 2011). Por ejemplo el áfido *Myzus persicae* induce ambas vías en *Arabidopsis*, aunque los ARNs de los genes de defensa regulados por JA se acumulan en bajos niveles (Moran et al., 2002). Para el caso de *M. tanajoa* cuando se evalúa en el

material NAT31, este induce las proteínas de defensa reguladas por JA y ABA, reprimiendo los de respuesta a AS y etileno. Para el caso del material 60444 induce las vías de SA, JA y etileno, además se activa la de auxinas y brasinoesteroides (Tablas suplementarias 3 y 4). En nuestro estudio la interacción es con una planta resistente y una “susceptible”, por esta razón es de esperarse que la respuesta varíe respecto a las interacciones mencionadas anteriormente y, por tanto, encontramos que *M. tanajoa*, según del genotipo con el que interactúe, puede generar resistencia a la vía de defensa dependiente de JA y en otros puede contrarrestar la defensa de la planta por varios mecanismos. En un caso el ácaro suprime la inducción de JA y activa la vía dependiente del SA con el fin de incrementar su “fitness” (Kant et al., 2008). Son necesarios trabajos más detallados, pero para el caso de 60444, el ácaro verde probablemente suprimió la inducción de volátiles relacionados a JA, pero la infestación pudo inducir genes relacionados con volátiles que atraen enemigos naturales como depredadores del ácaro verde. De hecho se identificaron cuatro proteínas de defensa inducidas y una reprimida, reguladas por JA, una inducida regulada por JA y ácido abscísico (ABA), dos por JA y etileno (ET), y una proteína fuertemente reprimida, regulada por SA para el material 60444 (Figura 11 y Tablas suplementarias 3 y 4).

En el caso de las proteínas inducidas regulados por JA, para el material NAT31 solamente se expresa una proteína para JA, una lipoxigenasa (at3g45140), la cual se mantiene reprimida a las 6h, 24h y a los 4d se induce y se mantiene hasta los 8d. Por el contrario 60444 activa 3 proteínas, uno de ellos al igual que NAT31, es una lipoxigenasa (at3g45140) y se reprime a las 6h y 24h, induciéndose a los 4d y 8d. Por el contrario la proteína allene oxide synthase (at5g42650) se induce a las 6h y 24h y se reprime a los 4d y 8d. La otra proteína, el ATOPR2 (at1g76690) se induce a las 6h y 8d, luego se reprime a las 24h y 4d. Existen ciertas proteínas que se comparten para los dos genotipos y la forma como se expresan es similar. La regulación de la proteína ATOPR2 puede ser relevante porque se ha demostrado que funciona como regulador en las vías del JA y ET (Ellis & Turner, 2001), este gen codifica para una celulosa sintasa (*CESA3*) involucrada en la formación de pared celular primaria. También están los regulados por ET, para el caso de NAT31 el gen DEAD box RNA helicase (at1g55150) se mantiene reprimido durante todos los tiempos. Mientras

que en el material 60444 se activan cuatro proteínas, dos de ellas, el 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (at5g43450) y EFE (ethylene-forming enzyme) (at1g05010), se inducen durante todos los tiempos. La proteína 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (at5g43450) se induce a las 6h y 8d, mientras que a las 24h y 4d se reprime. Mientras que la proteína DEAD box RNA helicase (at1g55150) se induce a los 4d y 8d, permaneciendo reprimida a las 6h y 24h. Para el caso de ABA, NAT31 activa dos proteínas: la NCED4 (nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4) (at4g19170) y el indole-3-acetaldehyde oxidase (at2g27150), las cuales se inducen a las 24h y 8d y se reprimen a los 4d. Mientras que 60444 solo activa una proteína; el FIP1 (FH interacting protein 1) (at1g28200), el cual se induce solamente a los 4d y permanece en estado basal en los otros tiempos.



**Figura 11.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en metabolismo de hormonas.



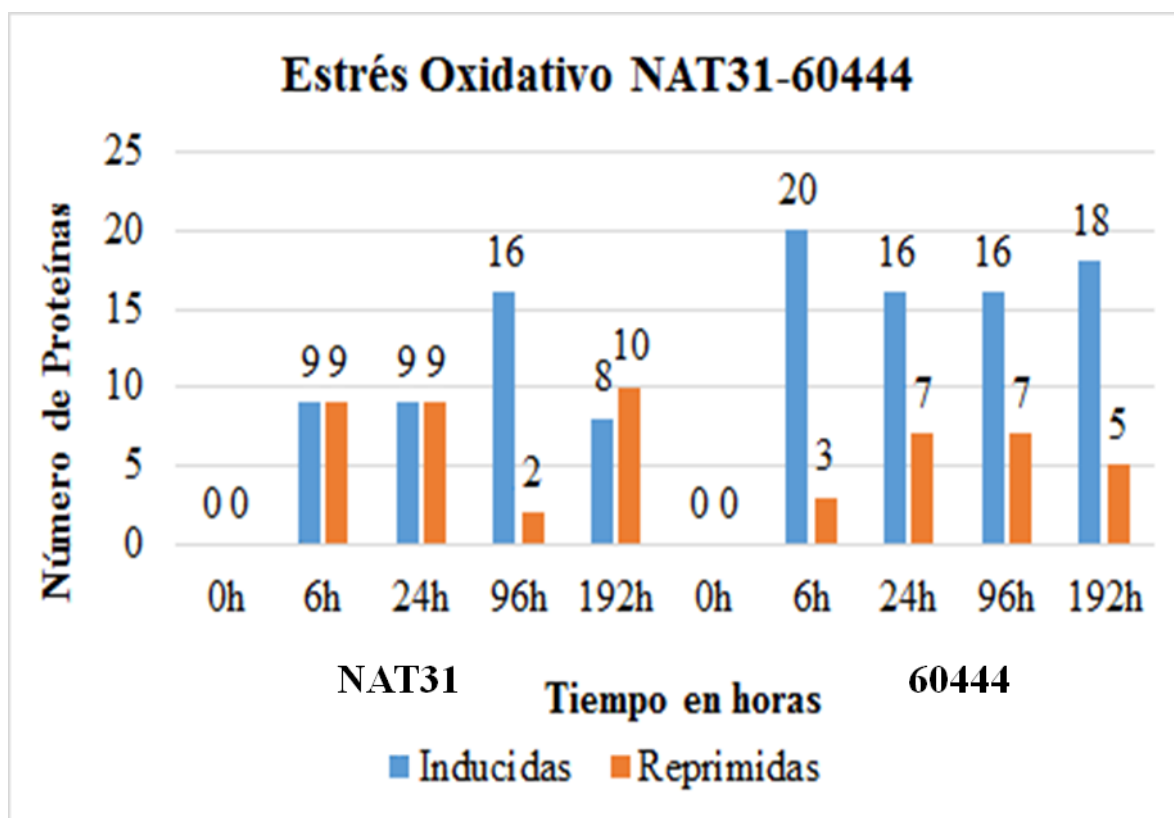
### **3.2.5.2.1 *Mononychellus tanajoa* induce las vías de JA/ET, AS, auxinas, brasinoesteroides, ABA en yuca**

Nosotros encontramos dos tipos de respuesta cuando se compara el material resistente NAT31 y el material susceptible 60444. NAT31 no activa ni etileno, ni AS, mientras que 60444 activa fuertemente esas hormonas. NAT31 no induce proteínas durante todos los tiempos, mientras que 60444 induce 9 proteínas: 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (at5g43450); EFE (ethylene-forming enzyme) (at1g05010); 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (at2g30830); BSMT1; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (at3g11480); HYD1 (HYDRA1); C-8 sterol isomerase (at1g20050); CAND1 (“cullin-associated and neddylation dissociated”) (at2g02560); OPR2 (at1g76690); PIN3 (pin-formed 3); auxina: “hydrogen symporter/ transporter” (at1g70940); AIR12; “extracellular matrix structural constituent” (at3g07390).

### **3.2.5.3 Estrés oxidativo**

Cuando se comparan las proteínas relacionadas con ROS (del inglés, “Reactive Oxygen Species”) entre los materiales NAT31 y 60444, se encuentran proteínas de estado redox, peroxidasa y glutatión S-transferasa. El material 60444 duplica en número de proteínas a NAT31 lo cual puede deberse al tipo de mecanismo de defensa que emplea cada genotipo. Así, mientras 60444 estaría activando una respuesta inducida, NAT31 activaría una constitutiva, ya preestablecida. La gran mayoría de organismos aeróbicos usan el O<sub>2</sub> como aceptor final en la cadena de transporte de electrones de la respiración. En este proceso el O<sub>2</sub> puede ser reducido para formar especies con oxígeno reactivo, ROS, tales como el radical superóxido (O<sup>-</sup>), el 2 peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (OH). Progenesis identificó en la familia de grandes enzimas 43 proteínas para el material NAT31 y 57 para 60444; 21 proteínas significativas para la categoría funcional implicada con estado redox, 2 para la categoría peroxidasa y 6 para la glutatión S-transferasa (Tablas suplementarias 5 y 6, Figura 12). Catorce proteínas fueron inducidas y cuatro reprimidas, con FDR que van de cero a 10%. Como puede observarse en la figura 16, para el caso de NAT31 durante los tiempos 6h, 24h y 8d las proteínas inducidas y reprimidas mantienen

una proporción de 1:1, pero a los 4d de interacción con el ácaro verde se inducen proteínas relacionadas a estrés, una respuesta bien particular en este material tolerante a la plaga. Por el contrario el material 60444 durante todos los tiempos son más las proteínas inducidas que las reprimidas. Se puede decir que necesita mantener inducidos todo el tiempo estas proteínas durante el ataque pero que no son suficientes o no responden de la mejor forma al ataque del ácaro verde. Es decir, para el sistema 60444 y el ácaro verde la respuesta de estas proteínas puede ser contrarrestada por el mecanismo de defensa empleado por el ácaro. Además esto sugiere que hay una acumulación y detoxificación de ROS durante el ataque de *M. tanajoa*, indicando que la alimentación de este artrópodo podría inducir ROS en yuca y esta acumulación podría influenciar en el asentamiento y sobrevivencia de *M. tanajoa* en la planta. Entre las proteínas reguladas implicadas en ROS encontramos NADPH oxidasas y deshidrogenasas.



**Figura 12.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en estrés oxidativo.

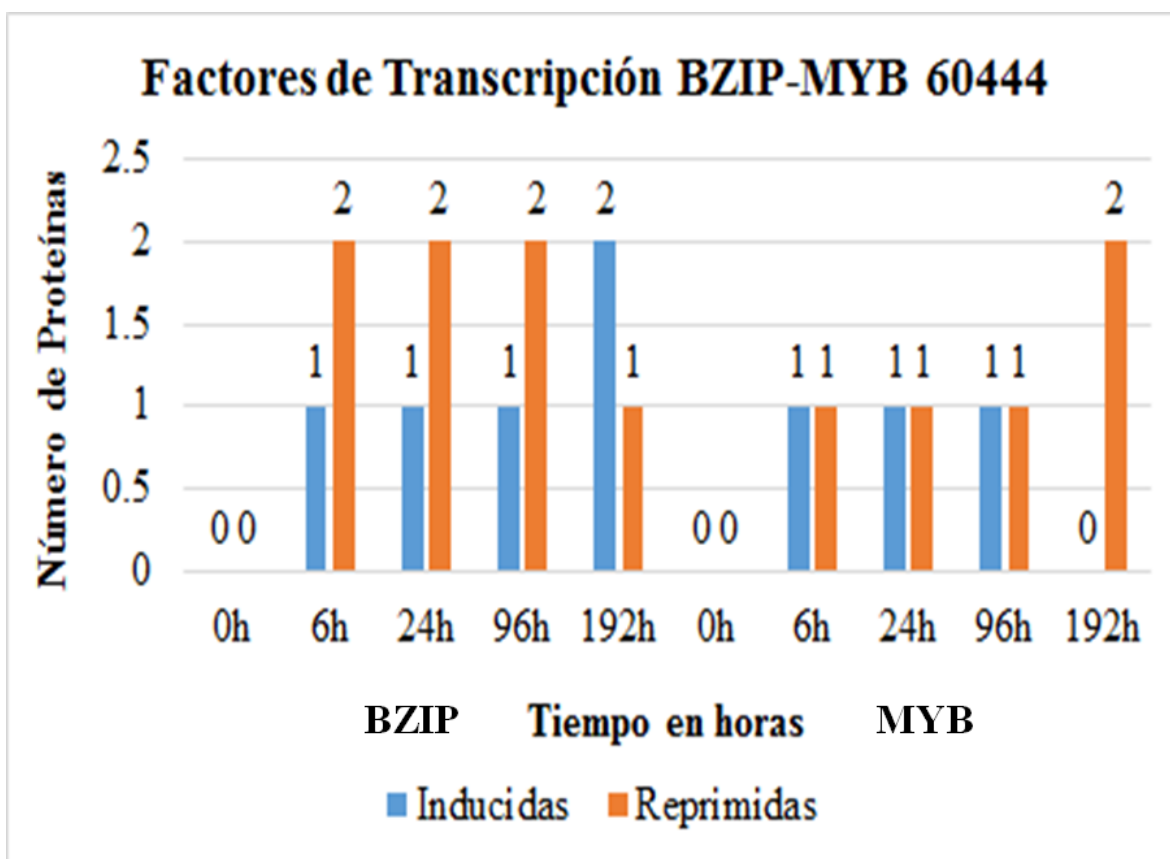
### **3.2.5.3.1 *Mononychellus tanajoa* induce en yuca, enzimas que están involucradas en la generación y detoxificación de ROS**

En el caso de la interacción yuca - *M. tanajoa* se encontró que la infestación indujo la expresión de ciertas enzimas antioxidantes, mientras reprimió otras (Figura 12, Tablas suplementarias 5 y 6). Entre las proteínas reguladas implicadas en ROS encontramos *NADPH* oxidasas y deshidrogenasas, citocromos P450 relacionados con los complejos de oxidación-reducción, oxidoreductasas. Para el material NAT31 se indujeron 5 proteínas durante todos los tiempos del ataque: WCRKC2 (wcrkc thioredoxin 2) (at5g04260); ATGPX1 (glutathione peroxidase 1) (at2g25080); ATPRX Q; antioxidant/ peroxiredoxin (at3g26060); MDAR4 (monodehydroascorbate reductase 4); monodehydroascorbate reductase (NADH) (at3g27820). Y para el material 60444: ATGLDH (l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase) (at3g47930); SAPX (stromal ascorbate peroxidase) (at4g08390); NTRC (nadph-dependent thioredoxin reductase c) (at2g41680); GR (glutathione reductase) (at3g54660); APX4 (ascorbate peroxidase 4) (at4g09010).

### **3.2.5.4 Factores de transcripción**

En este estudio, a nivel proteómico solo se identificaron FT en el genotipo 60444. Muy probablemente el genotipo NAT31 los activa a nivel transcripcional durante la interacción y esto representa otra diferencia crucial para entender la resistencia del genotipo NAT31 y la potencial tolerancia de 60444 empleando un mecanismo de respuesta de defensa inducida, diferente a la de NAT31. En la categoría funcional de señales de transducción fueron activados cinco FT pertenecientes a dos familias, entre ellas MYB y bZIP. Para el FT bZIP, se activaron 3 proteínas; haloácido dehalogenasa-ligado a hidrolasa (at1g68710); familia de proteína TraB (at1g05270); TGA6 (tgacg motif-binding factor 6) (at3g12250). El primero se induce a las 6h, 24h y 8d, y los otros dos se reprimen durante todo los cuatro tiempos. Para bZIP, 2 proteínas: ATCDC5 (arabidopsis thaliana ciclo de división celular 5) (at1g09770) y el factor de transcripción myb (at1g49010). El primero (at1g68710) se activa a las 6h y 24h, reprimiéndose a los 4d y 8d, y el otro se reprime (at3g12250) durante todo el tiempo en el genotipo 60444 (Figura 20; Tabla suplementaria 7). Es interesante notar que el

ataque de *M. tanajoa* reguló algunos de los FT implicados en resistencia mediada por *genes R* como el *receptor transmembrana* (at1g27170) que regula las vías de señalización activadas por SA y reprime las del JA.

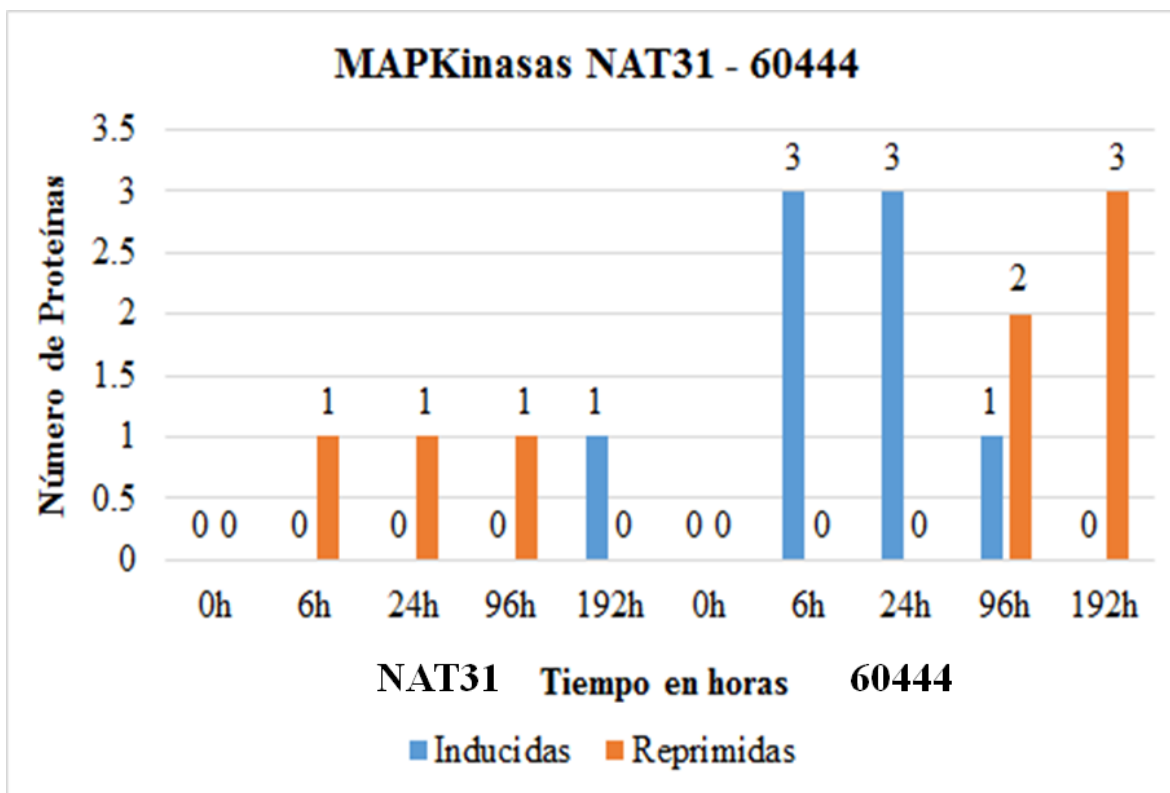


**Figura 13.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en factores de transcripción para el genotipo 60444.

### 3.2.5.5 Flujo de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

En este estudio se identificó para NAT31 una proteína relacionada con MAPKinasas; el gen que codifica para *MEKK1* (*map kinase kinase kinase 1*) (at4g08500), un receptor transmembrana el cual se reprime durante los cuatro tiempos. Para el caso de 60444 se identificaron tres proteínas: ATMKK5 (*arabidopsis thaliana* mitogen-activated proteína

kinasa kinasa 5) (at3g21220); ATMPK13; MAP kinasa/kinasa (at1g07880); ATMKK2 (arabidopsis thaliana map kinasa kinasa 2) (at4g29810), los cuales se inducen a las 6h y 24h, y se reprimen a los 4d y 8d (Figura 14; tablas suplementarias 8 y 9). Podría decirse que el material 60444 activa rápidamente las vías de transducción de señal por medio de estas tres proteínas cuando se da el ataque del ácaro verde para dar una respuesta de tipo inducida que en últimas no es suficiente para repeler el ataque del ácaro.

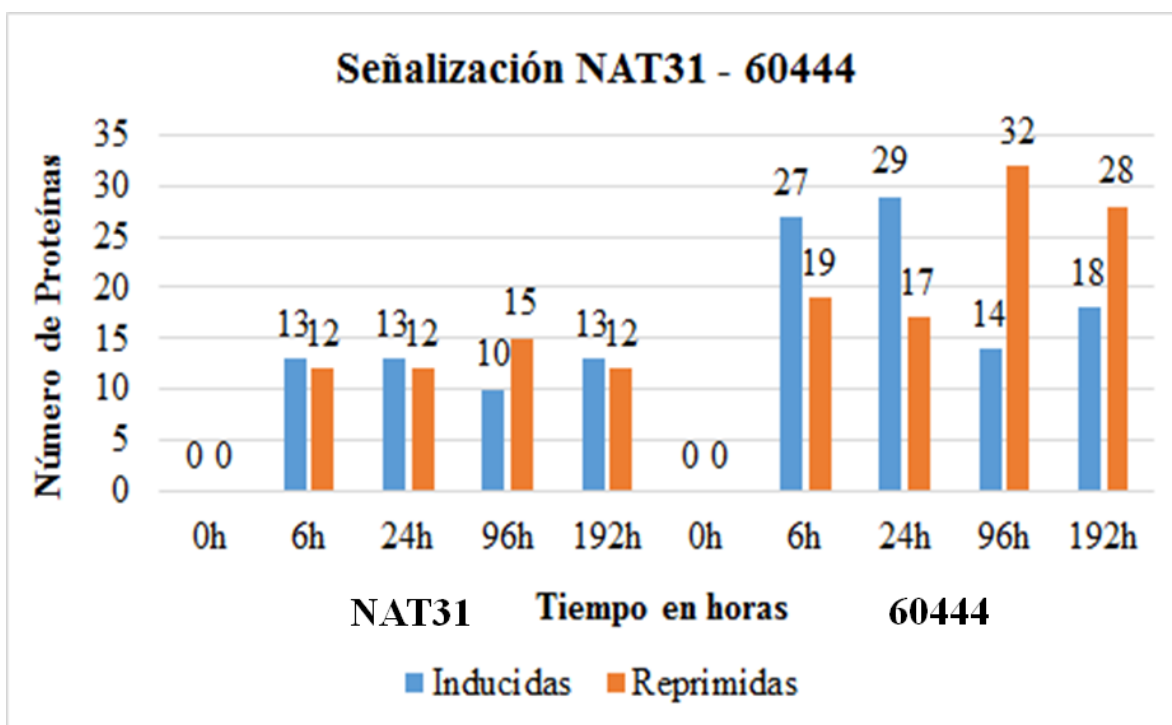


**Figura 14.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en MAPK.

### 3.2.5.6 Señalización

Al comparar los dos genotipos se puede evidenciar que para NAT31 las proteínas inducidas y reprimidas se mantienen en una proporción 1:1 para todos los tiempos, por el contrario 60444 induce más proteínas a las 6h y 24h, mientras que a las 4d y 8d son más los que se reprimen. Se observa otra clara diferencia entre los dos genotipos, NAT31 mantiene el

mismo número de proteínas inducidas durante todos los tiempos, mientras que para el material 60444 el número de genes inducidos se reduce a los 4d y 8d (Figura 15; Tablas suplementarias 10 y 11). Es necesario realizar trabajos más detallados a nivel transcriptómico para establecer si es más importante el número o el tipo de proteínas afectadas, como también si va a depender del genotipo evaluado.

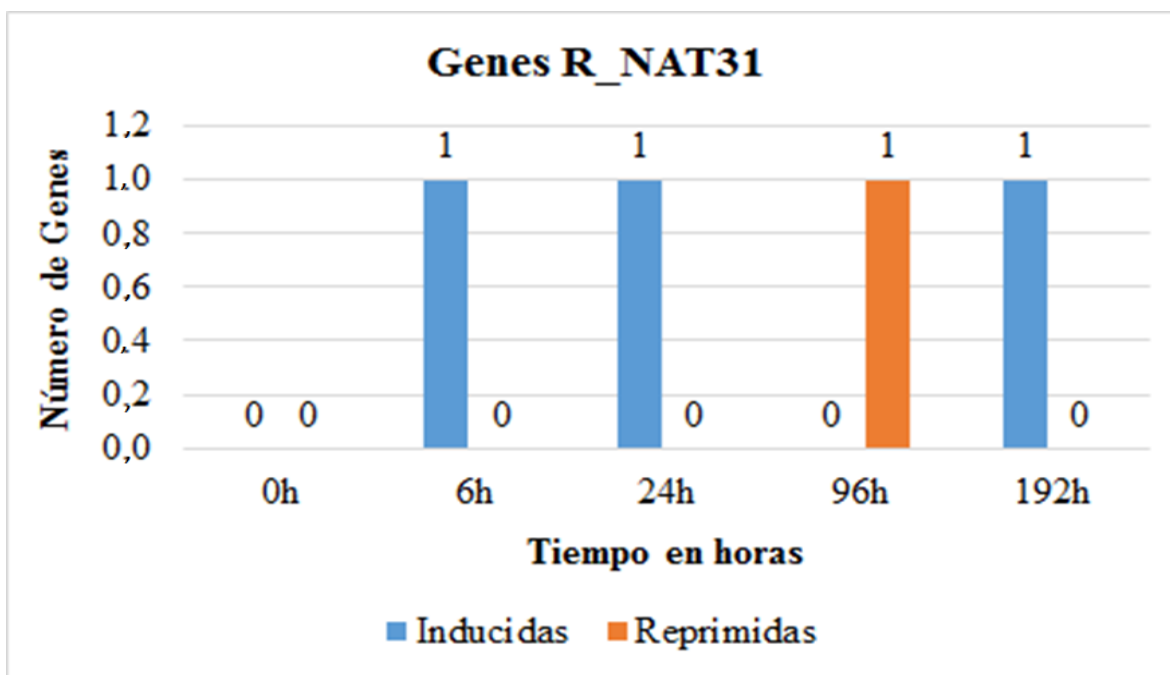


**Figura 15.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en señalización.

En el material NAT31 se induce fuertemente durante todos los tiempos una proteína (at1g67310) relacionado con unión a calmodulina, implicado en la respuesta directa a ataque por ácaros. Este genotipo activó una proteína de reconocimiento receptor transmembrana (at1g27170), la cual se indujo durante casi todos los tiempos, lo que indicaría que tan pronto el material NAT31 detecta mediante toque la presencia del ácaro en las hojas, se activa la señalización mediada por el receptor transmembranal, seguido de la cascada mediante calmodulina para generar una respuesta de defensa.

### 3.2.5.7 Proteínas de reconocimiento

Dentro de la respuesta de defensa de la planta podemos encontrar genes de resistencia PR y genes R (genes de reconocimiento). En nuestro trabajo solo fueron activados en el material NAT31, un receptor transmembranal (at1g27170), el cual se induce a las 6h, 24h y 8d, reprimiéndose a los 4d. Vale la pena resaltar la importancia de los genes R relacionada con la respuesta de señalización MAPKinasas y calmodulina (Figura 16; Tabla suplementaria 12).



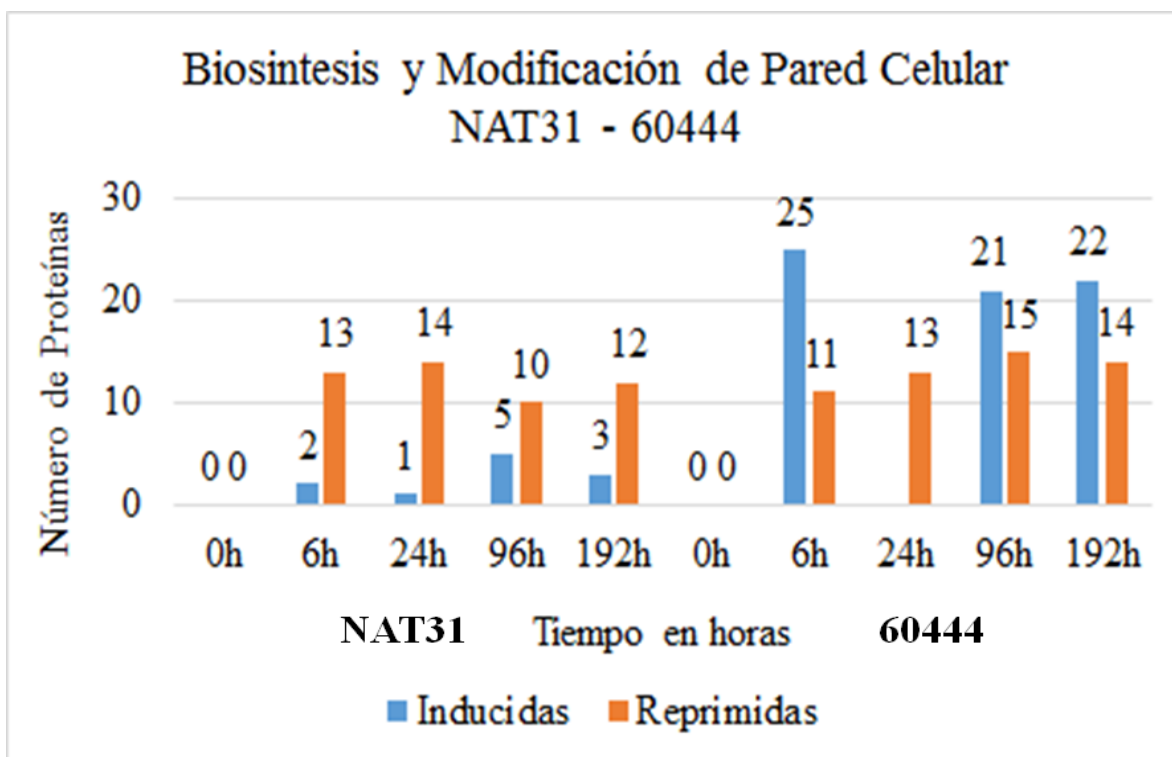
**Figura 16.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en reconocimiento-genes R solamente para NAT31.

### 3.2.5.8 Biosíntesis y modificación de pared celular

Dentro de los estreses bióticos, se encuentran los genes relacionados con pared celular, los cuales se inducen para reforzar barreras de defensa constitutiva por alteración en la composición de pectina, modificación de las proteínas y constituyentes químicos. La pared celular provee una importante barrera para patógenos y plagas. Después de la alimentación

por *M. tanajoa*, fueron regulados algunos genes que codifican proteínas que modifican la pared celular. Para el caso de NAT31 activa 15 proteínas: PMEPCRf (pectina metilesterasa pcr fragment f) (at5g53370); familia de proteína pectinesterasa (at4g02320); PGIP1 (poligalacturonasa inhibidor de proteína 1) (at5g06860); ATEXPA4 (arabidopsis thaliana expansina a4) (at2g39700), estas cuatro proteínas se inducen durante la señalización, la primera proteína se induce a las 24h y 4d, mientras que los otros tres se inducen solamente a los 4d, el resto de proteínas se reprime todo el tiempo. A los 4d se indujo una proteína ATEXPA4, la cual codifica para un gen expansina. Este tipo de expansina tiene un papel relacionado con la rápida extensión o relajación por estrés de la pared celular de la planta, así como importantes funciones en desarrollo (Cosgrove, 2000). Sumado a esto se identificó una proteína que influencia la integridad y modificación de la pectina, este es el PMEPCRf (pectina metilesterasa pcr fragment f) (at5g53370) la cual codifica para una pectinesterasa, que puede estar envuelta en la inhibición de patógenos. NAT31 induce fuertemente las proteínas: caffeoyl-CoA 3-O-metiltransferasa (at4g34050); ATOMT1 (o-metiltransferasa 1) (at5g54160); las cuales son enzimas claves de la vía de los fenil propanoides, importantes en la biosíntesis de cumarinas y lignina. Para el caso del material 60444 se inducen proteínas relacionados con pared celular durante todos los tiempos, 10 proteínas se indujeron durante todos los tiempos: ATCSLE1; celulosa sintasa (at1g55850); pectato liasa (at1g67750); MUR1 (murus 1); GDP-manosa 4,6-dehidratasa (at3g51160); RGP1 (reversibilidad glicosilato polipéptido 1); celulosa sintasa (at3g02230); (1-4)-beta-mannan endohidrolasa (at5g01930); pectinesterasa (at5g20860); citidililtransferasa (at1g53000); ATPME3; pectinesterasa (at3g14310); ASD1 (alpha-l-arabinofuranosidasa 1); alpha-N-arabinofuranosidasa/hidrolasa (at3g10740); FLA2 (fasciclina-ligada arabinogalactano 2) (at4g12730). Pero se inducen más proteínas a las 6h. En esta vía igualmente el material 60444 induce el doble de proteínas cuando se compara con NAT31 (Figura 17; Tablas suplementarias 13 y 14). En la tabla 18, las proteínas resaltadas con rojo corresponden a todas aquellas que se indujeron durante todos los tiempos. Se puede decir que el tipo de respuesta de defensa y el mecanismo para cada genotipo es diferente, el material 60444 activa proteínas de defensa.



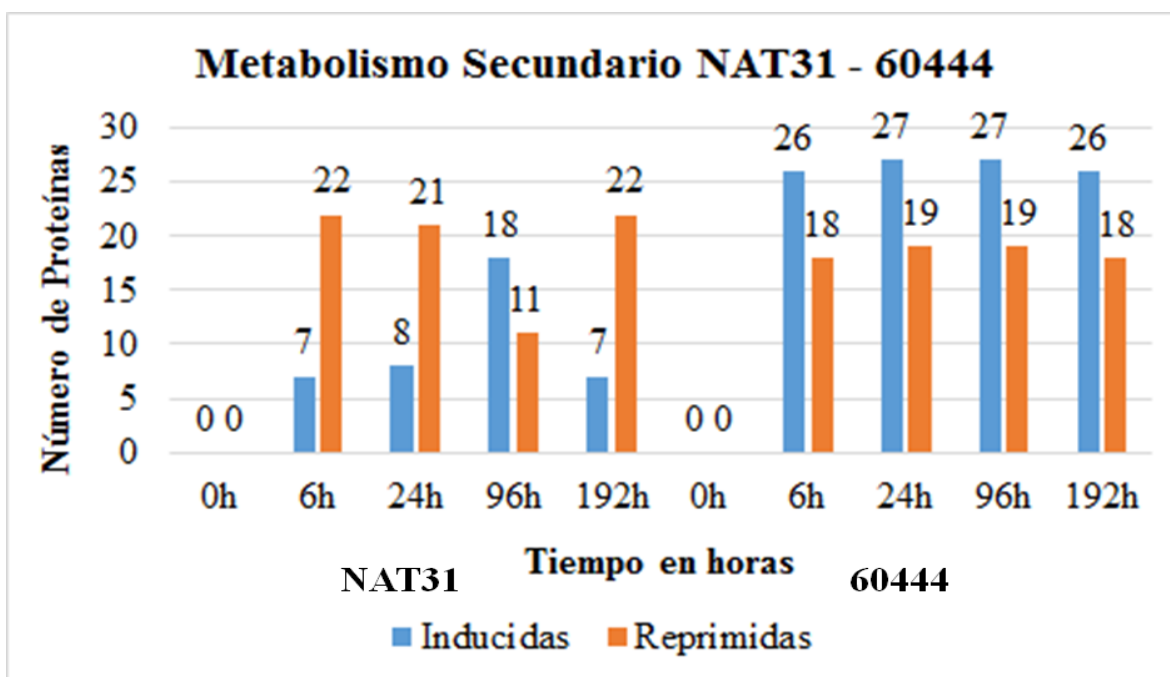


**Figura 17.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicados en biosíntesis y modificación de pared celular.

### 3.2.5.9 Metabolitos secundarios

En este estudio los materiales NAT31 y 60444 presentan niveles bajos de ácido cianhídrico. Los dos materiales comparten dos proteínas las cuales se inducen durante todos los tiempos, estos son: LI3-1 (gen elicitor-activador 3-1), oxidoreductasa (at4g37980) y ATCAD4; cinnamil-alcohol deshidrogenasa (at3g19450). NAT31 presentó 3 proteínas que se inducen durante todos los tiempos, los ya mencionados y CAD6 (cinnamil alcohol deshidrogenasa 6) (at4g37970) y 60444 induce 14 proteínas más durante todo los tiempos, estos son: ATOMT1 (o-metiltransferasa 1); caffeato O-metiltransferasa (at5g54160); PAL4 (fenilalanina amonio-lasasa 4) (at3g10340); ELI3-2 (gen elicitor-activado 3-2); aril-alcohol deshidrogenasa (at4g37990); pal1 (Phe amonio liasa 1) (at2g37040); TT7 (testa transparente 7); flavonoide 3'-monooxigenasa (at5g07990); CER3 (eceriferum 3); oxidoreductasa (at5g57800); HCT (hidroxicinnamoil-coa chiquimato/quinato hidroxicinnamoil transferasa) (at5g48930); ATCDPMEK (4-(citidina 5'-fosfo)-2-c-metil-d-

eritritol kinasa) (at2g26930); familia amino oxidasa (at1g57770); isoflavona reductasa (at4g39230); aldo/ceto reductasa (at1g59960); 4-cumarato--CoA ligasa (at4g05160); APG1 (albino o mutante verde 1); 2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinona metiltransferasa (at3g63410); HDR (4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa) (at4g34350) (Figura 18; Tablas suplementarias 15 y 16). Al comparar los dos genotipos el material 60444 duplica el número de proteínas que se inducen durante todos los tiempos, nuevamente indicando que este material tiene que hacer el doble esfuerzo para responder al ataque del ácaro verde.

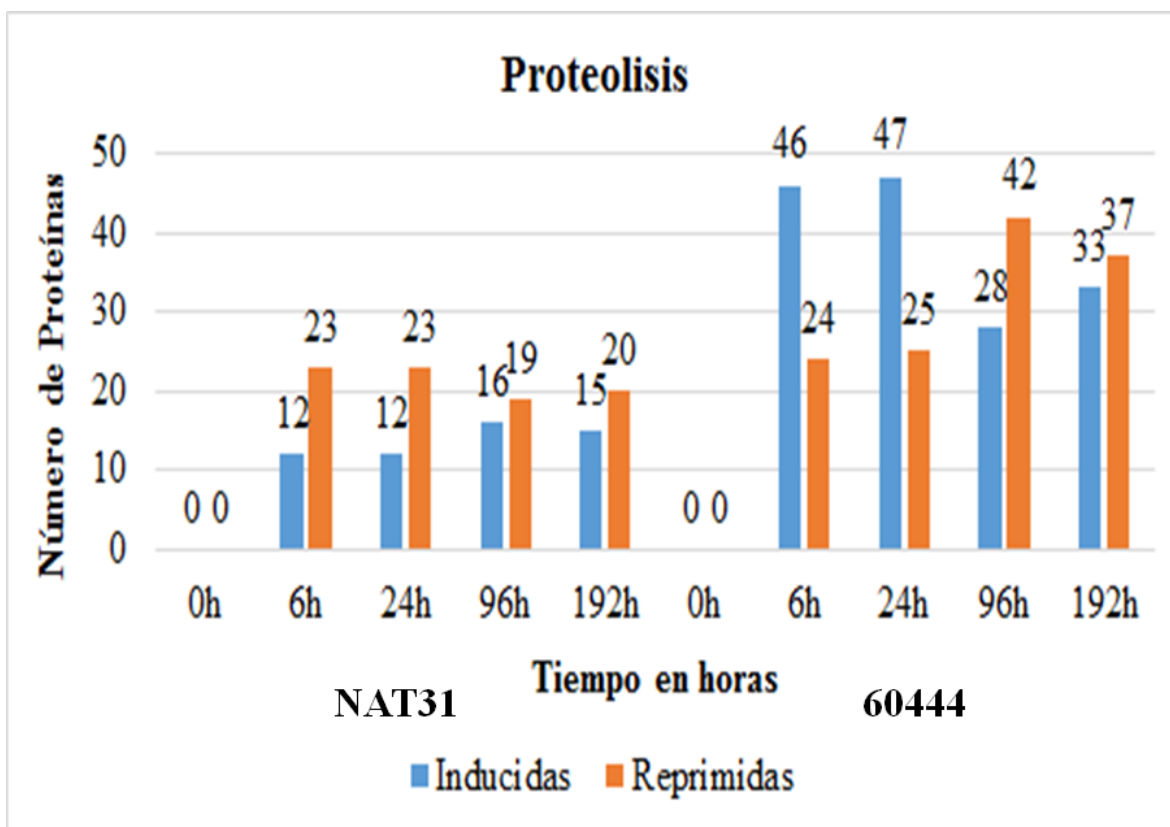


**Figura 18.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en el metabolismo secundario.

### 3.2.5.10 Proteólisis

Nosotros identificamos en el material NAT31, 3 proteínas con actividad proteolítica inducidas durante todos los tiempos: scpl29 (serina carboxipeptidasa-ligado 29); serina-tipo carboxipeptidasa (at4g30810); DEGP1 (DegP proteasa 1); serina-tipo endopeptidasa (at3g27925) y subtilasa (at4g30020). Los dos primeros igualmente se inducen en 60444 con otros 18 que se indican en la Figura 19 y Tablas suplementarias 17 y 18. Nuevamente el material 60444 duplica en número e intensidad de proteínas a NAT31. Igual que en genes

de defensa y metabolismo secundario el genotipo 60444 estaría haciendo un doble esfuerzo por contrarrestar el ataque del ácaro verde. Es importante mencionar que todas estas vías metabólicas están relacionadas con la respuesta de defensa al ataque.



**Figura 19.** Distribución de las proteínas reguladas por *M. tanajoa* a través de las comparaciones y tiempos, implicadas en proteólisis.

## 4 DISCUSIÓN GENERAL

Los organismos foto autótrofos son la base de todas las cadenas tróficas que sostienen los diferentes ecosistemas de la biosfera. Dentro del grupo de consumidores primarios (herbívoros), se encuentra un gran número de organismos dentro de los cuales, los artrópodos se destacan por su diversidad, abundancia y estrategias alimentarias para acceder a las plantas como fuente de energía. Indiscutiblemente, los insectos herbívoros están dentro del grupo de organismos más perjudiciales para las plantas (Karban & Baldwin, 1997) no obstante, los ácaros (arácnidos) representan también un taxón muy importante dentro del grupo de fitófagos plaga a nivel mundial. En general, los artrópodos utilizan varios mecanismos para alimentarse a partir de todos los tejidos de la planta, tanto de la parte aérea como de la raíz, y causan daño mecánico sobre el respectivo órgano. El ácaro verde de la yuca por ejemplo, utiliza su estilete para succionar los fotosintetizados. Su estrategia consiste en ubicarse en el envés de las hojas y crear toda una red de telarañas durante la colonización, la cual tiene funciones de protección, vivienda y confiere una mayor movilidad.

Evolutivamente, las plagas se consideran uno de los principales factores de selección. Ellas han moldeado las poblaciones de acuerdo con la presión que ejercen favoreciendo determinadas combinaciones génicas. En ese orden de ideas, se puede entender que la yuca ha sido sometida por parte del ácaro verde a una enorme presión de selección y en esa interacción, ha desarrollado mecanismos y características de defensa para contrarrestar dicho ataque. Esas características de defensa, han sido importantes para desarrollar resistencia y confrontar al ácaro directamente. Las estrategias de defensa varían desde afectar la preferencia del ácaro por la planta o, su éxito reproductivo sobre la planta hospedera o indirectamente, atrayendo enemigos naturales (Kessler & Baldwin, 2001; Dicke et al., 2009). Este tipo de interacciones como la del sistema ácaro verde–yuca son muy complejas razón por cual, es muy difícil determinar qué características anatómicas, fisiológicas, genéticas y evolutivas son las que permiten limitar la infestación del ácaro verde por parte de la yuca. A continuación, se discuten cada uno de los componentes de

este trabajo; la evaluación fenotípica y el análisis proteómico en donde se analizan los aspectos más significativos de éstos, los cuales son la piedra angular para entender los mecanismos que emplean los materiales resistente NAT31 y el “susceptible” 60444 en respuesta al ataque del ácaro verde. Luego se hará una discusión global para articular los dos componentes y comprender la interacción dada entre el ácaro verde y la yuca.

Como se afirmó, la interacción de yuca con el ácaro verde se considera un fenómeno complejo y en realidad, son pocos los trabajos encaminados a entender los procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante dicha interacción. Dentro de las defensas de las plantas al ataque de las plagas, hacen parte la defensa constitutiva y la inducida. El material NAT31 presenta defensas constitutivas como ceras, tricomas y metabolitos secundarios (Shepherd et al., 2005) mientras que 60444 solo presenta metabolitos secundarios. Previo al ataque, se puede dar un reforzamiento de la defensa preexistente y el establecimiento de nuevas defensas, por ejemplo cuando el ácaro pone sus huevos (Hilker & Meiners, 2010). Así mismo, cuando el artrópodo camina sobre el envés de las hojas (Peiffer et al., 2009) o al emitir feromonas (Fatouros et al., 2008) puede generar cambios de los inductores en yuca. Se consideran como defensas directas de la planta, aquellas que afectan la eficiencia del herbívoro y las defensas indirectas como la atracción de enemigos naturales de los herbívoros mediante la producción de compuestos volátiles.

La diversidad de las plantas está dada en cierta medida a la presión de selección que ejercen los diferentes tipos de estreses abióticos y bióticos sobre ellas para poder adaptarse al medio terrestre. Entre los últimos, la herbivoría es uno de los que más afecta el desarrollo de las plantas. Éstas se han adaptado con el transcurrir del tiempo y han generado diferentes mecanismos como barreras físicas preformadas, tricomas, dureza de tejidos, ceras, resinas, látex, repelentes, compuestos volátiles, compuestos tóxicos y los metabolitos secundarios, usados para contrarrestar el ataque de los herbívoros como por ejemplo los glicósidos cianogénicos los cuales liberan en últimas cianuro, básicamente lo que hace es bloquear la enzima citocromo oxidasa. Según Bellotti et al. (2002), las plagas de yuca como los ácaros verdes han coevolucionado con el cultivo y han desarrollando estrategias para sobrevivir. Para el caso del ácaro verde, éste es olífago, se alimenta principalmente de la familia

Euforbiaceae, específicamente del género *Manihot*, lo que lo convierte en un herbívoro especialista. Este tipo de relaciones entre el ácaro verde y la planta hospedera de yuca generan un cambio evolutivo recíproco, es decir coevolución “arms race” (Ehrlich & Raven, 1964; Futuyma, 1983; Futuyma & Agrawal, 2009). Cuando el ácaro verde empezó a consumir yuca, estaba ejerciendo una presión de selección sobre las plantas de yuca las cuales generarían una respuesta defensiva, esta relación tan específica sería el producto de la estrecha evolución de un rasgo en consecuencia de la evolución del otro, generándose una reciprocidad en la cual ambos rasgos evolucionan. Esta reciprocidad ha sido usada para explicar la evolución de una gran diversidad de características de defensa en plantas, como los tricomas, espinas, resinas y metabolitos secundarios (Anderson & Mitchell-Olds, 2011, Rausher, 2001). Esta teoría asume que los herbívoros ejercen presión de selección sobre las características que reducen daño al herbívoro (Thompson, 2001; Schaller, 2008). Se ha hipotetizado que las características defensivas son una barrera efectiva contra herbívoros generalistas, ya que estos pueden alimentarse de otras plantas (Agrawal & Heil, 2012, Agrawal, 2011), mientras que los herbívoros especialistas tienden a desarrollar mecanismos para vencer defensas del hospedero (Rausher, 2001; Lankau, 2007; Kliebenstein et al., 2002, Shonle & Bergelson, 2000; Castillo et al., 2014). Los especialistas identifican su hospedero basados en las características defensivas como metabolitos secundarios, imponiendo selección negativa sobre estas características (Ali & Agrawal, 2010; Bidart-Bouzat & Kliebenstein, 2011; Nieminen et al., 2003). Thompson (1999) plantea, en el mecanismo coevolutivo de “escape y radiación”, que las adaptaciones de los herbívoros y sus plantas ha sido la fuerza que impulsa la especiación. Existen varios trabajos que demuestran que los herbívoros han desarrollado estrategias para modificar las defensas de las plantas para su beneficio como por ejemplo usando sus metabolitos secundarios para protegerse de los enemigos naturales (Ehrlich & Raven, 1964, Futuyma & Agrawal, 2009). Después de la introducción del modelo coevolutivo, muchos trabajos fueron planteados para esclarecer los patrones filogenéticos resultado de las interacciones planta – herbívoro, y los mecanismos que determinan la variación en la expresión de características de defensa (Stamp, 2003; Agrawal, 2007).

Los mecanismos moleculares de la resistencia de yuca al ataque de una plaga pueden ser entendidos gracias a las diferencias existentes entre los dos genotipos NAT31 y 60444. Son varios los trabajos en donde se acepta que la interacción planta-artrópodo está asociada a la dinámica de proteínas (Chen et al., 2011; Maserti et al., 2011; Podda et al., 2014; Liu et al., 2014). Esa dinámica de proteínas fue establecida en los dos genotipos evaluados, generando diferencias significativas en cambios a nivel de proteína en diferentes procesos celulares. El análisis comparativo de dos genotipos contrastantes para el ataque del ácaro verde a yuca fue adoptado para identificar proteínas responsables del mecanismo de defensa y posibles vías que están potencialmente involucradas en la respuesta de defensa. Cuando se da la interacción entre el ácaro verde y yuca, lo que se busca es evaluar dicha interacción y se aborda desde los componentes fenotípico y genotípico, en este caso mediante una aproximación proteómica. Para el componente fenotípico se evaluaron parámetros biológicos del ácaro (oviposición, rango de oviposición y tiempo de desarrollo) sobre dos materiales de yuca contrastantes para la resistencia al ácaro verde (NAT31: material resistente y 60444: material “susceptible”).

Son varios los trabajos que han centrado sus investigaciones en comprender los mecanismos que las plantas utilizan para defenderse y la relación ecológica de la evolución para entender la defensa de la planta (Fraenkel, 1959; Hartmann, 2008; Agrawal, 2011). En la búsqueda por entender las interacciones entre planta – herbívoro, cada vez es más necesario estudiar la importancia de la diversidad ecológica de los herbívoros como un factor primordial en la formación evolutiva de las estrategias de defensa de las plantas (Fox, 1981; Lankau & Strauss, 2008). El trabajo de Carmona & Fornoni (2013) evalúa patrones de selección natural sobre dos estrategias principales de defensa en plantas: resistencia y tolerancia, básicamente todas aquellas características que reducen el daño o que reducen el impacto sobre el “fitness” para determinado daño, respectivamente, según la complejidad del herbívoro, es decir si es generalista o especialista. Con su trabajo demuestran que la complejidad ecológica selecciona estrategias mixtas para resistencia y tolerancia, y contradicen hipótesis pasadas donde se plantea que la resistencia y tolerancia son dos tipos de defensa que se excluyen mutuamente (Van der Meijden et al., 1988).

Las tablas 3 y 4 muestran la tendencia de los materiales NAT31, ALT6 de baja oviposición y rango de oviposición, y que el material 60444 presenta una tendencia muy alta a la oviposición, más que el material considerado como susceptible (CMC40) al ser evaluado con otras plagas. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Mesa et al. (1987) para CMC40. En contraste las otras accesiones muestran algún grado de antixenosis y antibiosis. Es necesario realizar ensayos a nivel molecular para validar esta hipótesis, como por ejemplo evaluación detallada mediante PCR en tiempo real evaluando genes relacionados con antibiosis (inhibidores de proteasas), genes relacionados con reforzamiento de pared celular. Aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa, la preferencia de oviposición de 60444 fue relativamente alta comparado con las otras accesiones (Tabla 3, 4). Los experimentos I y II a libre y no libre escogencia para la preferencia de oviposición fueron determinantes para seleccionar de los diez materiales escogidos (ALT6, ALT12, PER335, PER182, CMC40, ECU72, ECU160, COL1505, NAT31 y 60444) los dos materiales contrastantes (NAT31 y 60444). Según los experimentos el material NAT31 es el menos preferido para oviposición y 60444 fue el material más preferido. Una de las características del material NAT31 es su resistencia a mosca blanca (Bellotti, 2002), la cual se debe a la introgresión generada a partir de sus parentales los materiales ECU72 y BRA19 (resistentes a mosca blanca). Muy probablemente esos genes que le confieren resistencia a mosca blanca pueden a su vez generar resistencia al ácaro verde, no sabemos si estamos ante un material con posible resistencia múltiple a plagas en yuca.

En los ensayos a libre y no libre escogencia, NAT31 fue identificado como el menos preferido, mientras que 60444 fue el más preferido en términos de preferencia de oviposición del ácaro verde. La oviposición es la forma como los insectos o artrópodos aseguran su progenie, su especie y de esta manera pueden alcanzar altas poblaciones para perpetuarse en un ecosistema. Por tal razón al NAT31 ser menos preferido por el ácaro verde, es capaz de romper la continuidad de la progenie y el éxito para que una especie se mantenga en un ecosistema, logrando controlar la infestación de la plaga. Existen varios trabajos en donde se habla de la resistencia de NAT31 a mosca blanca (*A. socialis*): Bohórquez, (2009), plantea que NAT31 presenta características de antibiosis y antixenosis



contra la mosca blanca. Burbano et al. (2007), evaluaron la resistencia natural de especies silvestres de *Manihot* a tres plagas de yuca; *Mononychellus tanajoa* (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis* y *Phenacoccus herreni* (Hemiptera). Vargas et al. (2002), fueron los primeros en reportar las bondades de NAT31, variedad de yuca (*M. esculenta*) como material resistente a mosca blanca (*A. socialis*) para el valle del Alto Magdalena. El genotipo ALT6, mostró resultados consistentes en los dos experimentos, siendo el menos preferido por *M. tanajoa* y fue estadísticamente similar al ser comparado con NAT31. En contraste cuando se comparan los genotipos con mayor preferencia, 60444 y CMC40, difieren estadísticamente en el experimento I a libre escogencia, siendo 60444, superior en un 50% cuando se compara con CMC40.

En todos los bioensayos de ambos experimentos (a libre y no libre escogencia), los ácaros verdes mostraron la misma tendencia, la accesión NAT31 fue la menos preferida y 60444 la más preferida. Para el caso de los genotipos ECU72, ECU160, PER182 y PER335 presentan un comportamiento similar. Según varios trabajos estos materiales son clave en el origen de la resistencia para las moscas blancas (Burbano et al., 2003; Bohórquez, 2009; Carabalí et al., 2009; 2010a, 2010b). En general, nuestros resultados muestran que *M. tanajoa* tiene alta preferencia por los genotipos 60444 luego por CMC40, un material utilizado durante mucho tiempo como el material control para diferentes evaluaciones a estreses. Esta preferencia está relacionada con agentes físicos y químicos; dentro de los físicos pueden existir barreras preformadas o constitutivas que influyen en la adaptación del ácaro a yuca y químicos como metabolitos secundarios que influyen sobre la atracción o repelencia (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven et al., 2005; Dicke & Hilker, 2003; Dicke & Baldwin, 2010; Piesik et al., 2011).

Los resultados obtenidos en *M. tanajoa* sobre CMC40 ( $14,35 \pm 0,31$  días) distan de los registrados por Mesa et al. (1987), en donde el tiempo de desarrollo fue establecido sobre el mismo hospedero (7,8 días a 30°C). En otros estudios como el de Yaseen y Bennet (1977), el desarrollo total, de huevo a adulto fue de 11-13 días, a  $26,8 \pm 2^\circ\text{C}$  y 82% de H.R. en la mañana y 55% en la tarde. Yaninek et al. (1982), obtuvieron una duración del ciclo de vida de huevo a adulto de 21,3; 15,5; 12,3; 7,7 y 6,9 días a 20, 24, 27, 31, y 34°C,

respectivamente. Comparando nuestros resultados con los trabajos anteriores, el tiempo de desarrollo fue similar. En los estudios de Yaseen y Bennet (1977) y Yaninek et al. (1984), se estableció que el tiempo de desarrollo de *M. tanajoa* es inversamente proporcional a la temperatura. En nuestro estudio se establece que existe variación en el tiempo de desarrollo para un material, ECU160, indicando que existe diferencia significativa ( $P = 0,05$ ), teniendo en cuenta la temperatura y los genotipos. Además, para los diferentes estadios de desarrollo entre los diferentes genotipos de yuca existe diferencia significativa (Tabla 6; Figura 7). Esto fue observado como el tiempo de desarrollo más largo del ácaro verde (11,07-15,10 días) sobre todos los genotipos evaluados (Tabla 5). El tiempo de desarrollo tiene un comportamiento igual al reportado por Yaseen y Yaninek et al. (1977). Además se puede decir que el comportamiento del ácaro verde está estrechamente relacionado con yuca y su respuesta depende de esa interacción. Como conclusión y tendencia general, 60444, fue el genotipo en el que se encontraron los más altos promedios para rango de oviposición y preferencia de oviposición, lo cual indica una mejor adaptación del artrópodo sobre este hospedero. Existen varias características del ácaro que ayudan a esto, como su alta tasa de mutación y su distribución en el campo mediante colonias, lo cual reduce en gran medida el flujo genético entre ellos, dificultando la dilución de los genes resistentes (Mesa et al., 1987; Saito et al., 1983; Helle & Overmeer, 1973). Es necesario evaluar a nivel de genes y molecularmente este tipo de respuesta para justificar su comportamiento.

En resumen, los resultados combinados de la biología y la preferencia de oviposición muestran que el genotipo NAT31 exhibe niveles medios de resistencia al ácaro verde *M. tanajoa*, y su resistencia es caracterizada por antixenosis. Esto se debe en gran parte a las diferencias establecidas entre la oviposición y el tiempo de desarrollo, sugiriendo que los factores relacionados con oviposición y tiempo de desarrollo de *M. tanajoa* son probablemente responsables de la diferencia que se establece entre los genotipos evaluados. Se podría decir que cada genotipo de yuca evaluado en este trabajo puede responder de forma diferente durante la interacción con el ácaro verde. El material NAT31 mostró baja incidencia de poblaciones de *M. tanajoa*, lo que puede indicar niveles medios de resistencia al ácaro verde, lo cual puede ser explotado en programas de mejoramiento genético para hacer selección asistida con marcadores moleculares para la resistencia al ácaro,

considerada una de las plagas más importantes en las Américas, África y Asia (CIAT, 2006). La información generada en este estudio tiene potencial valor para estudios moleculares en la generación de biomarcadores moleculares, con el fin de transferir genes para resistencia al ácaro verde a partir de NAT31.

Una vez establecido los materiales contrastantes para la característica de resistencia al ataque del ácaro verde se hizo el análisis proteómico para los dos materiales; NAT31 como resistente y 60444 como material “susceptible”, con este análisis se evidencio que para la gran mayoría de categorías funcionales (estrés biótico, metabolismo secundario, señalización, genes de defensa, proteólisis, metabolismo de hormonas, estrés oxidativo, factores de transcripción, genes de reconocimiento, modificación de pared celular) el material 60444 duplica y triplica en número de genes al material NAT31. Mientras que el material NAT31 mantiene una respuesta conservadora y al relacionar las características anatómicas que presenta (tricomas, ceras, epidermis particular) se puede decir que su mecanismo de defensa es de tipo constitutivo, igualmente se inducen genes de resistencia y de otro tipo para contrarrestar el ataque del ácaro verde. Para el caso del material evaluado como “susceptible” según el análisis fenotípico, el análisis proteómico muestra que se inducen una serie de genes durante el ataque, lo que podría ser es que estemos ante un posible material con baja tolerancia, es necesario evaluar a nivel fenotípico más parámetros como los demográficos, a su vez es necesario realizar infestaciones en invernadero y en campo en plantas completas para evaluar el daño y algunos parámetros agronómicos en la planta como rendimiento, peso fresco, calidad de raíz entre otros. Este tipo de análisis fenotípico más completo podría dar seguridad de la resistencia, tolerancia y susceptibilidad de los materiales evaluados.

Las investigaciones relacionadas con la defensa de plantas dentro de un contexto evolutivo se centran sobre características de las resistencias de tipo químico y físico. El concepto de coevolución fue introducido por Ehrlich & Raven (1964), en donde se propone una selección y adaptación recíproca entre las defensas químicas de las plantas y la contra defensa de los insectos. En nuestro estudio el ácaro verde y yuca han coevolucionado durante muchos años, el ácaro verde se caracteriza por ser un herbívoro especialista, en este estudio se seleccionaron dos genotipos contrastantes para la resistencia al ácaro verde

teniendo como criterio solo algunos parámetros biológicos (oviposición, rango de oviposición y tiempo de desarrollo), según el parámetro de preferencia de oviposición con ensayos a libre y no libre escogencia el material menos preferido fue NAT31 y el material más preferido fue 60444. Según los análisis proteómicos los materiales NAT31 y 60444 respondieron a nivel molecular (proteínas reguladas) de forma diferente, es decir el material NAT31 mostró una respuesta de defensa de tipo constitutivo en contraste con 60444 que tuvo una respuesta inducida. Estas respuestas pueden aportar a la explicación de la coevolución de yuca con el ácaro verde. Un primer aspecto a tener en cuenta es que el material NAT31 fue seleccionado y domesticado para resistencia a la mosca blanca y sus parentales (ECU72 y BRA19) son resistentes a esta plaga, pero se caracteriza además por características altas de rendimiento, calidad de raíz, arquitectura, etc. (Bellotti, 2002). La domesticación de yuca ha sido usada para que a partir de materiales silvestres se vaya introgressando genes de resistencia a materiales cultivables. ECU72 y NAT31 se caracterizan por presentar tricomas en la epidermis de las hojas, ceras y compuestos fenólicos, los cuales influyen en la efectividad en la colonización del ácaro verde sobre el material NAT31. Durante varios años la interacción del ácaro verde con yuca ha generado adaptaciones de ambas partes, es importante aclarar que la evolución de las defensas de las plantas es muy complejo (Agrawal, 2011). Con los resultados de este trabajo que buscaba entender el mecanismo de defensa a nivel molecular de yuca durante el ataque del ácaro, nos muestra una visión general del comportamiento de dos genotipos uno resistente y otro “susceptible” que responden a nivel proteómico de manera diferente y contradictoria según los reportes de la literatura. Ya que el material denominado resistente NAT31 induce pocas proteínas relacionados con resistencia, mientras que el material denominado “susceptible” 60444 induce fuertemente proteínas de resistencia. No se puede asegurar rotundamente que la respuesta del material 60444 sea contradictoria, nuestra hipótesis es que el material 60444 presenta niveles bajos de tolerancia, por esto su respuesta es de tipo inducida. El parámetro biológico de oviposición escogido para denominar un material como resistente o susceptible no es suficiente, confiable y completo, por tal razón es aconsejable hablar de materiales que fueron menos o más preferidos para oviposición por el ácaro verde. Es necesario complementar los análisis fenotípicos evaluando más parámetros biológicos como: longevidad, fecundidad; y parámetros demográficos (tasa de reproducción neta,

tiempo medio generacional, tasa intrínseca de crecimiento de la población, tiempo de doblaje y tasa finita de crecimiento), además se debería evaluar en la planta: daño directo causado en la planta, los porcentajes de daño, de supervivencia de las plantas, del área foliar consumida y de reducción de los rendimientos, las diferencias en tamaño de las plantas (altura, grosor de tallos, tamaño de hojas, etc.), las tasas de crecimiento del cultivo y el número relativo de insectos atraídos por un genotipo en comparación con otros. Una vez evaluados todos estos parámetros biológicos y demográficos de la planta y del artrópodo podemos hablar con seguridad de materiales resistentes, tolerantes y susceptibles.

La expresión de características de defensa en plantas de manera constante es denominada constitutivo, ya que esas características se desarrollan bajo el continuo establecimiento y crecimiento de la planta. Este tipo de defensa esta categorizado dentro de las defensas directas, caracterizados por factores físicos a nivel estructural, morfológico, proteínas de defensa y metabolismo secundario (Howe & Jander, 2008). El material que presentó este tipo de defensa fue NAT31, ya que esté genera un impacto negativo sobre la preferencia para oviposición, lo que se denomina antixenosis. Y muy probablemente el material 60444 presenta características morfológicas que tienen un impacto negativo sobre la eficiencia del ácaro verde; como el tiempo de desarrollo, inducción de inhibidores de proteasas y lectinas, lo que se denomina antibiosis. En este sentido para el material NAT31 la defensa de la planta generalmente es de tipo constitutivo, es decir siempre se expresa en la planta y es independiente del ataque del herbívoro. Para el caso de 60444 cuando el ácaro empieza a alimentarse genera una respuesta de tipo inducida, en donde se acumulan una serie de inhibidores de proteasa y otros metabolitos secundarios (Green & Ryan, 1972). Según Karban & Baldwin (1997) cambios en la planta después de daño es generado por una respuesta inducida. Además el material 60444 induce varios factores bioquímicos como proteínas antinutritivas, metabolitos secundarios, toxinas y factores ecológicos como ácidos grasos volátiles que generan preferencia a herbivoría, atrayente de enemigos naturales y eficiencia en interacciones tritróficas determinantes en la respuesta inducida (Karbon & Baldwin, 1997; Kessler & Baldwin, 2001). Además el material 60444 produce metabolitos secundarios tanto químicos volátiles como no volátiles en respuesta al daño por alimentación (Paré & Tumlinson, 1999; Agrawal et al, 1999; Farmer, 2001; Heil, 2009;

Rasmann & Turlings, 2007; Kost & Heil, 2008). La respuesta inducida se puede clasificar en resistencia inducida y defensas inducidas. La primera no necesariamente beneficia a la planta, como puede reducir el daño generado por el herbívoro también puede volver a la planta más vulnerable a otros daños potenciales (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal & Karban, 1999). Las defensas inducidas son aquellas que minimizan el “fitness” de manera negativa al herbívoro produciendo químicos que atraen o no enemigos naturales (depredadores y parasitoides), este tipo de respuesta genera beneficios a la planta (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal & Karban, 1999). Para el material 60444 se indujo una producción de volátiles como una estrategia secundaria en defensas inducidas indirectas durante el ataque del ácaro verde. Estos volátiles son producidos en respuesta al ataque del herbívoro y se conocen como HIPVs (volátiles inducidos en plantas por herbívoros), los cuales atraen artrópodos carnívoros (depredadores y parasitoides) (Dicke & Van Poecke, 2002; De Moraes et al., 1998; Arimura et al., 2005; Turlings & Ton, 2006; Dicke & Baldwin, 2009; Hare, 2011).

Existe una hipótesis relacionada con el paradigma de los generalistas-especialistas, en la cual se dice que los herbívoros especialistas pueden causar inducción distinta de la defensa de las plantas comparada con las inducidas por los generalistas (Bowers & Stamp, 1993; Agrawal, A., 2000; Poelman et al., 2008). Los generalistas son mucho más sensibles a las toxinas de las plantas que los especialistas, una predicción es que los generalistas pueden suprimir la inducción de la respuesta de la planta, mientras que el especialista puede solo minimizar la inducción de altos niveles de defensa. Desde la perspectiva de la planta, la inducción de defensas directas puede ser variable contra los especialistas, mientras inducción de defensas indirectas puede ser fuerte. Nosotros nos centramos más en la predicción sobre el paradigma del herbívoro generalista y el especialista. Este último puede ser menos impactado por la defensa de la planta que un generalista (Whittaker & Feeny, 1971), también algunos especialistas tienen la capacidad de usar las mismas características establecidas por la planta hospedera para protegerse de depredadores, mientras que los generalistas pueden tener un mecanismo básico general para tolerar un arreglo de defensa de plantas y a su vez poseer mecanismos para manipular las plantas (Krieger et al., 1971; Whittaker & Feeny, 1971). La predicción va enfocada en que los generalistas tienen la

capacidad de enmascarar en un solo aspecto la respuesta de la planta, la cual posee una historia evolutiva común que conduce a la formación de factores fisiológicos en una cadena de transducción de señal (p.e. la señalización de jasmonato-JA). Otro punto importante es que la respuesta inducida de la planta para un especialista puede ser distinta cuando se compara con la respuesta de un generalista.

En este estudio para los dos materiales evaluados (NAT31 y 60444) según el análisis proteómico se inducen y reprimen fuertemente proteínas relacionadas con estrés biótico. Para el caso de NAT31 se da el reconocimiento mediante genes R, un receptor transmembranal que probablemente reconocen la presencia de quitina, mientras que en el material 60444 no se da este reconocimiento, para los dos materiales se da la cascada de señalización mediante las MAPKinasas, son más las proteínas inducidas en 60444 que en NAT31, seguido por la despolarización de la membrana plasmática para los dos materiales, la diferencia es que en NAT31 se da flujo de iones calcio que generan aumento de calmodulina típico en la cascada de señalización para ácaros, mientras que con 60444 solo se da una inducción fuerte de flujo de iones calcio, esto desencadena la activación de la cascada de señalización de las proteínas quinasas seguida por la de fitohormonas. Para NAT31 se inducen el JA/ABA/Brasinoesteroides, mientras que en 60444 se inducen fuertemente JA/ET/AS/Auxinas/Brasinoesteroides/ABA, a su vez compuestos volátiles relacionados con atrayentes de enemigos naturales, mientras que en NAT31 no se presenta. En ambos genotipos se da una detoxificación de ROS con citocromo oxidasa y una modificación y reforzamiento de la pared celular, para 60444 se inducen más proteínas relacionadas con este proceso, acompañada de un estallido oxidativo. Después en 60444 se inducen factores de transcripción que activan genes de defensa, lectinas e inhibidores de proteasa, mientras que en NAT31 no se presenta. En términos generales se puede establecer que NAT31 presenta una defensa de tipo constitutiva, mientras que 60444 una defensa inducida. En la gran mayoría de categorías funcionales 60444 duplica y triplica en número de genes a NAT31 y además expresa genes diferentes a este material a nivel de respuesta de defensa (pared celular, metabolismo secundario, estrés biótico), pero este mecanismo no es suficiente para detener el ataque del ácaro. Vale la pena aclarar que la evaluación fenotípica fue hecha hasta los 8 días, se hicieron observaciones hasta que la planta murió. Para el caso

del material 60444 fue a los 30 días. Por el contrario, NAT31 soporta el ataque y logra recuperarse. Esto puede ser indicio de una respuesta a nivel genético molecular durante una interacción temprana (6h, 24h) y una tardía (4d y 8d) cuando un material resistente (NAT31) y otro susceptible (60444) son atacados por el ácaro verde.

En el presente trabajo se aisló una proteína similar a quitinasa básica (*CHIB* ó *PR-3*) en el genotipo 60444 a las 24h y 8 días, probablemente inducida por la vía del JA/ET según la literatura. La aplicación exógena en plantas de oligómeros de quitina purificados activan los genes PR y la síntesis de fitoalexinas, y en trabajos con microarreglos se han obtenido un gran número de genes de *Arabidopsis* inducidos por quitina (Shibuya & Minami, 2001; Zhang et al., 2002). Varias proteínas de ligación a quitina asociadas a membrana, presumiblemente receptores de quitina, han sido identificados en varias especies como la soya (Day et al., 2001) y arroz (Kaku et al., 2006). En nuestro estudio se encontró una proteína de ligación similar al gen *BRH1* (*brassinosteroid- responsive ring-h2*) en el genotipo NAT31 durante todos los tiempos, el cual se ha encontrado que se acumula por la presencia de quitina en *Arabidopsis* (Molnár et al., 2002). Molnár et al. 2002 mediante un análisis con microarreglos encontraron un gen diferencialmente expresado el activador transcripcional *MYC2* el cual tiene un dominio *bHLH* (“basic helix-loop-helix zip”). En estudios realizados por Lorenzo et al. (2004) se mostró que *MYC2* tiene un papel central dentro de la vía de señalización de JA, regula la respuesta de defensa a insectos y responde a la inducción por quitina. Sumado a esto, Lyou et al. (2008) demostraron que el gen *AtLEC* de *arabidopsis* que codifica una proteína tipo lectina es inducido por múltiples estímulos incluyendo herida, JA/ET y quitina. En el presente trabajo se aisló una secuencia similar a un receptor quinasa; proteína quinasa, para el genotipo NAT31 a las 24h y 8 días. A pesar de no haber encontrado un receptor de quitina en el presente trabajo, tal vez debido a que es una expresión muy temprana, los resultados anteriores sugieren que la quitina presente en el exoesqueleto del ácaro verde es probablemente un candidato a inductor de la respuesta de defensa en yuca. O tal vez al estar expresado constitutivamente, y su expresión no está de-regulada por la interacción con el ácaro. Básicamente la respuesta de PR se da cuando el ácaro verde inserta sus quelíceros y empieza a alimentarse del floema del envés de las hojas, lo que genera un cambio en la composición molecular dentro de cada célula y



estrechamente relacionado con la defensa directa de la planta. Se da un estallido oxidativo, se expresan genes relacionados con metabolismo secundario y mantenimiento celular (Zhu-Salzman et al., 2004). En este trabajo se indujeron proteínas relacionadas con estrés oxidativo, genes relacionados a metabolismo secundario y metabolismo celular. La activación de las proteínas NB-LRR puede inducir diferentes respuestas dependiendo de la hormona implicada, en este caso sobre el ácido salicílico (AS) y especies reactivas de oxígeno (ROS) para 60444. En este estudio ambos genotipos (NAT31 y 60444) expresaron este tipo de proteínas PR, pero las vías señalización de las fitohormonas fueron diferentes.

La quitina junto con las gluproteínas hace parte de la matriz peritrófica, una capa protectora que recubre el intestino del ácaro verde. Esta matriz protege el epitelio del intestino del artrópodo contra alimentos abrasivos, toxinas, estrés oxidativo, microorganismos y mantiene la compartimentalización de las enzimas digestivas. La ruptura de la matriz peritrófica podría interferir con las funciones digestivas, las relacionadas con absorción y predisponer susceptibilidad al artrópodo a patógenos y toxinas (Zhu-Salzman et al., 2008). Las lectinas son un importante grupo de proteínas que se unen a ciertos dominios de azúcares con alta especificidad. El papel de las quitinasas en defensa contra herbívoros no ha sido bien establecido, sin embargo, plantas de tomate transformadas con una quitinasa inducible de *Populus* spp. *WIN6*, mostraron actividad contra el escarabajo *Leptinotarsa decemlineata* (Lawrence & Novak, 2006), lo que indica una respuesta por acción directa sobre la matriz peritrófica del intestino del insecto. Nosotros identificamos en el material susceptible (60444) CHIB1, durante todos los tiempos que duro la interacción con el ácaro verde, a las 6h y 24h se da una fuerte inducción de esta proteína, la cual se disminuye a las 4d, pero nuevamente a los 8d triplica las proteínas que presentó a los 4d. Lo que posiblemente significa es su permanente actividad durante el ataque para matar ácaros. Esa mortalidad podría ser explicada por la acción de esta quitinasa, la cual podría tener un efecto sobre los adultos. Puede considerarse como un potencial candidato a proteína de defensa efector contra *M. tanajoa* en el genotipo susceptible (60444). Esta endoquitinasa no se presenta en el material NAT31, lo que podría explicar probablemente su mecanismo de antibiosis, el cual no tendría NAT31, explicada mediante un mecanismo de antixenosis. Existen muchas respuestas a nivel de genes clasificados dentro de categorías funcionales

que ayudan a sustentar esta hipótesis. El mecanismo empleado por el material 60444 sería una respuesta de defensa inducida, la cual activa varias proteínas relacionadas con defensa y duplica su expresión al compararse con el material resistente NAT31, además la inducción de cierta endoquitina nos llevaría a proponer cierto nivel de antibiosis. 60444 induce proteínas relacionadas con la respuesta de defensa mediada por JA, ET. Por el contrario el material resistente NAT31, no activa proteínas de la vía de JA/ET, ni endoquitinas, y la respuesta de defensa se activa solo a las 24h y 8 días, lo que nos podría estar indicando una respuesta de defensa constitutiva, muy relacionada con un mecanismo de tipo antixenótico. El JA tiene un papel primordial en la floración, fertilidad y en defensa contra patógenos e insectos, regulando la expresión de genes relacionados con defensa (Browse, 2009). Muchas plantas realizan un ajuste de varios procesos fisiológicos de manera sistemática con el fin de minimizar costos metabólicos mediante la reprogramación de expresión de genes (Siemens et al., 2002; Cipollini et al., 2003). Varios estudios usando microarreglos demuestran que el JA activa la coordinación de expresión de genes involucrados en biosíntesis JA, defensa y respuesta a estrés oxidativa, senescencia y modificación de pared celular, mientras que reprime la expresión de genes relacionados con metabolismo de clorofila y fotosíntesis (Schenk et al., 2000; Sasaki et al., 2001; Reymond et al., 2004; Sasaki-Sekimoto et al., 2005; Jung et al., 2007). El JA tiene un efecto dual sobre el crecimiento de la planta, división celular o defensa mediante la inducción de genes relacionados con defensa como la vía del metabolismo secundario (Pauwels et al., 2009).

Recientes avances en investigación en señalización de defensa revelan que SA, JA y ET funcionan como una compleja red de vías de señalización interconectadas (Pieterse et al., 2009). Interacciones entre estas vías generan en la planta un poderoso potencial regulatorio, que permitirían a la planta tener una respuesta de defensa según el tipo de plaga que ataque (Reymond & Farmer, 1998; Bostock, 2005). Un ejemplo bien estudiado de cruce entre vías, es la interacción antagónica entre la señalización de SA y JA, muchos estudios han demostrado que la acumulación endógena de la una, suprime inmediatamente la expresión de la otra (Bostock, 1999; Thaler et al., 2002). Por otra parte, la interacción entre JA y ET es uno de los ejemplos mejor estudiados de interacción de señales de defensa sinérgicas (Adie et al., 2007). Estudios previos han indicado que el JA/ET actúan concertadamente

para regular la expresión de un gen PR (*osmotin*) en tabaco y una defensina (*PDF1.2*) de *Arabidopsis* (Xu et al., 1996; Penninckx et al., 1998). Santamaria et al. (2001) encontraron que la expresión del gen *AtPRBI* en raíces de *Arabidopsis* era inducida por JA/ET y reprimida por SA en respuesta a patógenos necrótrofos, y Norman-Settlerblad et al. (2000) demostraron que la acción concertada de JA/ET inducía la expresión de genes de defensa (*Hevein*, *Basic chitinase ATCHIB*, *PDF1.2* y *VSP*) contra el patógeno necrótrofo *Erwinia carotovora* en *Arabidopsis*. Sin embargo, en el caso de la respuesta a herida en *Arabidopsis*, una interacción antagónica entre JA y ET en la activación de respuestas locales ha sido descrita por Rojo et al. (1998). En el presente estudio encontramos que el material NAT31 activa la vía de ABA, brasinoesteroides y JA, mientras que el material 60444 activa fuertemente las vías de JA/ET, AS. En nuestro caso, sugerimos un papel central de las defensas mediadas por JA/ET, AS, ABA y brasinoesteroides en la resistencia de la yuca a *M. tanajoa*. El hallazgo de secuencias similares a genes implicados en estas vías es una clara muestra de su participación en la respuesta de defensa (Tablas suplementarias 3 y 4, Figura 11). Lo más interesante es la presencia y activación de estas proteínas en el material susceptible (60444), las cuales se presentan por duplicado, lo que indica un doble esfuerzo por parte de este material para soportar por más tiempo el ataque del ácaro verde.

Goodspeed y colegas (2011) plantean la hipótesis que diversas formas de vida han evolucionado con el reloj interno y se puede anticipar cambios ambientales causados por la rotación de la tierra. Además evaluaron cómo el ciclo circadiano, actuando con señalización hormonal, puede generar ventajas a la planta al anticiparse y aumentar la defensa contra los herbívoros. Una de las hormonas que participa en la respuesta de defensa es el jasmonato, que al acumularse induce la expresión de diversos genes; esta regulación de la acumulación del jasmonato es dependiente del reloj, la cual provee un entendimiento del mecanismo regulatorio para la defensa anticipada al herbívoro. Existe un gran número de genes que han sido identificados en regular el ciclo circadiano (Covington et al., 2008), dentro de los más importantes están: *AOS* y *OPR3*, los cuales codifican enzimas esenciales para la biosíntesis de jasmonato. En este estudio se activaron fuertemente esos dos genes solamente en 60444, durante todos los tiempos (6h, 24h, 4d, 8d) en la interacción con el ácaro verde. Su

expresión se incrementó con el tiempo. Este genotipo tiene un comportamiento muy particular, probablemente la acumulación de *AOS* y *OPR3* que está muy relacionada con lo planteado por Goodspeed et al. (2011) para *Arabidopsis*. Posiblemente estos resultados preliminares en yuca nos den indicios relacionados con el control del ciclo circadiano, el cual puede darse por las fluctuaciones de jasmonato que conducen a la acumulación circadiana de metabolitos de defensa. Es necesario realizar estudios más detallados para validar esta hipótesis en yuca.

Las plantas han desarrollado múltiples estrategias de defensa, dentro de las cuales están las barreras físicas y químicas pre-existentes, las defensas inducidas se activan por ataque. Dentro de las defensas inducidas directas está la producción de proteínas anti-digestiva, metabolitos secundarios (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven et al., 2005) y entre las indirectas se encuentra la producción de volátiles las cuales son inducida por el herbívoro en plantas (HIPV), el cual atrae enemigos naturales (Dicke & Hilker, 2003; Dicke & Baldwin, 2010; Piesik et al., 2011, 2012). Algunos metabolitos secundarios hacen parte de la defensa constitutiva los cuales expresan compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y estos VOCs pueden ser inducidos cuantitativamente o cualitativamente después de la herbívora (Van Den Boom et al., 2004; Turlings & Ton, 2006; Dicke et al., 2009). El daño mecánico en la planta puede inducir producción de VOCs (ej., GLVs y terpenos), usualmente inducidos de manera rápida después de la lesión (Heil, 2009). Muchos terpenos VOCs y de la vía fenólica del ácido chiquímico, como índoles y metil salicilato, se producen después de lesión por herbívoros (De Moraes et al., 2001). Esta respuesta está relacionada con la producción de inductores específicos en la saliva del herbívoro los cuales inducen VOC en algunos sistemas planta – insecto (Turlings et al., 1990; Paré & Tumlinson, 1999). Existen en las plantas una variedad de elicitores que constituyen el mecanismo para detectar lesiones que estimulan la producción de ácido jasmónico (Heil, 2009). Cuando múltiples plagas atacan la planta, se establece una interacción compleja entre el ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico, que puede involucrar cruce de estas vías que generan una inhibición sinérgica al ataque mediante una respuesta de defensa (Pieterse et al., 2009). Piesik y colegas (2011 o 2012) establecieron diferentes niveles de inducción de VOCs dependiendo de la especie de *Fusarium* al ser inoculado sobre cebada, avena y trigo,

generando inducción de varios VOCs y diferentes concentraciones según el rango dado de *F. graminearum* > *F. culmorum* > *F. avenaceum*. La inducción de volátiles en plantas causada por herbivoría juega un papel vital en mediar interacciones tritróficas entre las plantas hospedadoras, herbívoros y enemigos naturales del herbívoro (Turlings & Ton, 2006; Heil & Ton, 2008; Dicke et al., 2009). Varios VOC pueden indirectamente actuar atrayendo enemigos naturales de artrópodos plaga (McCall et al., 1993; Mumm et al., 2008; Unsicker et al., 2009). Algunos de estos VOC tienen función específica. Por ejemplo de los terpenos, el linalool disuade la oviposición y atrae enemigos naturales (Kessler & Baldwin, 2001) y (*E*)- $\beta$ -farneseno disuade áfidos (Vuorinen et al., 2004). También el  $\beta$ -cariofileno atrae parasitoides (Lou et al., 2005; Cheng et al., 2007) y entomopatógenos de nematodos (Rasman et al., 2005). La manipulación de volátiles como señales para atraer efectivamente parasitoides y enemigos naturales depredadores como control biológico es una estrategia de las plantas para repeler el ataque de las plagas (Turlings & Ton, 2006). En este estudio se indujo fuertemente la proteína BSMT1 (S-adenosil metionina) durante todos los tiempos de la interacción del genotipo 60444 con el ácaro verde, mientras que el material NAT31 no expresó este gen. Es probable que al activar esta proteína, 60444 atrae enemigos naturales del ácaro. Es necesario realizar la validación de este tipo de genes para comprobar esta hipótesis.

Es necesario diseñar experimentos más detallados y finos para confirmar estos resultados y poder especular con respecto de la coevolución del ácaro con yuca, ya que hasta el momento no hay ningún trabajo que aporte evidencias en favor de la coevolución. Además de estos estudios es necesario hacer una reconstrucción filogenética de los estados ancestrales de yuca relacionados con perfiles de defensa, defensas químicas, defensas físicas específicas, producción de tricomas, ceras, compuestos fenólicos y alcaloides. Esto debe ir acompañado de estudios de historia de vida de yuca y del ácaro, como atributos genéticos y sistemas de apareamiento y reproducción (Kursar, 2009; Heil, 2009; Johnson et al., 2009). Es necesario hacer estudios ecológicos y filogenéticos que evalúen el impacto de los herbívoros sobre grupos hermanos que tengan diferencias en sus características defensivas. También es necesario estudiar las bases genéticas de la preferencia de hospedero y la interacción entre la variación genética y procesos ecológicos en la

interacción de yuca y el ácaro verde (Hawthorne & Via, 2001; Thompson, 1998; Kuussaari et al. 2000; Nylin et al., 2005). Muy probablemente para el caso de yuca puede existir una respuesta específica dependiendo del genotipo evaluado durante la interacción. Según Rosenthal & Kotanen (1994), una estrategia defensiva alternativa implica la evolución de rasgos que puedan permitir a la planta tolerar la herbivoría. Hasta el momento no es muy claro cómo se puede dar la evolución conjunta de resistencia y tolerancia (Núñez-Farfán et al., 2007, Kaiñho-Betancout & Núñez-Farfán, 2015). Las plantas resistentes previenen o reducen la cantidad de daño mediante defensas químicas y físicas como metabolitos secundarios (Ehrlich & Raven, 1964; Levin, 1973; Berenbaum et al., 1986; Wink, 2003), mientras que las plantas tolerantes pueden disminuir el impacto negativo del daño generado por el herbívoro, a su vez mantienen su “fitness” al inducir respuestas fisiológicas después del daño (Rausher, 1992; Stowe et al., 2000). Una hipótesis temprana por Van der Meijden (1988) propone una compensación entre resistencia y tolerancia la cual conduce a la fijación de una u otra estrategia de defensa (Fineblum & Rausher, 1995; Stowe et al., 2000), muchas poblaciones naturales involucran niveles intermedios de ambas estrategias de resistencia y tolerancia (Núñez-Farfán et al., 2007). Para el caso de yuca, los resultados proteómicos muestran una defensa constitutiva por parte del material resistente NAT31 y el material 60444 muestra una fuerte inducción de genes relacionados con defensa, muy probablemente se podría hablar de una baja tolerancia, valdría la pena evaluar la teoría planteada sobre la evolución de la defensa de las plantas empleando estrategias mezcladas de resistencia y tolerancia.

El trabajo de Carmona & Frononi (2013) muestra que la composición de la comunidad de herbívoros afecta la selección sobre la resistencia y la tolerancia. Al estudiar dos escarabajos uno especialista y otro generalista sobre la solanácea *Datura stramonium*, se puso al especialista a ejercer presión de selección sobre materiales tolerantes y resistentes, éste impuso selección direccional en materiales tolerantes, pero no presión de selección sobre materiales resistentes. Por el contrario, el escarabajo generalista seleccionó materiales resistentes y no tolerantes. Podría estar sucediendo lo mismo para el material 60444 con baja tolerancia, por tal razón el ácaro verde especialista ejerce más presión de selección sobre éste que sobre el material NAT31 que es resistente. Estos resultados son la evidencia

empírica que diferentes presiones de selección impuestas por múltiples consumidores son importantes en conducir a una evolución adaptativa de estrategias de defensa mezcladas de resistencia y tolerancia. Los herbívoros especialistas promueven una más intensa dinámica coevolutiva con la planta hospedera, ellos se adaptan más fácilmente a las barreras físicas y químicas del hospedero, imponiendo una fuerte presión de selección y promoviendo una contra-resistencia a la respuesta del hospedero (Futuyma & Moreno, 1988; Gould, 1988; Zangerl & Berenbaum, 2005).

Los genotipos NAT31 y 60444 inducen proteínas relacionadas con ROS, que atacan los principales componentes celulares, al causar daño por radicales libres y tienen gran efecto sobre proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Apel & Hirt, 2004). ROS juega un papel central en la defensa de las plantas contra patógenos pero en este caso interviene en la defensa contra un herbívoro, el ácaro verde. Durante esta respuesta, ROS son producidas por las células de la planta por la vía de las NADPH-oxidasas de la membrana plasmática, peroxidasas de la pared celular y amino-oxidasas en el apoplasto (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Bajo estas condiciones, concentraciones superiores a 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden ser producidas directamente o como resultado de la superóxido dismutasa. En contraste a la acción de la superóxido, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede difundirse dentro de las células y activar muchas defensas, incluyendo PCD (Dangl & Jones, 2001; Zhang & Xing, 2008). Durante la interacción planta-herbívoro, la actividad y los niveles de ROS son detoxificados por enzimas como catalasas, ascorbato peroxidasas y glutaredoxinas las cuales son reprimidas por la acción de SA y del óxido nítrico (NO) (Klessig et al., 2000). A medida que la planta produce más ROS, disminuye su capacidad para detoxificar durante la respuesta de defensa y se produce la acumulación de ROS y activación de PCD. La represión de los mecanismos de detoxificación de ROS es crucial para que ocurra PCD. La sola producción de ROS en el apoplasto, sin la represión de los mecanismos de detoxificación, no resulta en la inducción de PCD. Estudios al respecto han indicado un requerimiento absoluto de la producción coordinada de ROS y la represión de los mecanismos de detoxificación de ROS (Musser et al., 2002). Es posible que desde el momento que el ácaro verde toca la superficie del envés de las hojas de yuca se desencadena la respuesta de señalización. Luego cuando el ácaro empieza a alimentarse del

contenido celular, sus secreciones orales pueden generar una producción local y sistémica de especies de oxígeno reactivo (ROS) como se ha observado en otros floemófagos como los áfidos (Tjallingii, 2006). Muchas plantas responden de diferentes formas a los estreses bióticos generando ROS que participan en señalización defensiva y potencian una respuesta hipersensible (HR) en el sitio de la infección (Lamb & Dixon 1997). Algunas enzimas que participan en ROS pueden romper el equilibrio redox del artrópodo. Las perturbaciones en el equilibrio redox del intestino pueden causar la proliferación de radicales de oxígeno que dañan las proteínas, lípidos y el ADN (Walling, 2000). Las enzimas que producen radicales superóxido (como la *NADPH* oxidasa) o peróxido de hidrógeno (peroxidasas) pueden funcionar como proteínas defensivas en el intestino del herbívoro (Moran et al., 2002). En general la yuca parece enfrentar el reto de balancear entre generar ROS como mecanismo de defensa y producir enzimas detoxificantes para contrarrestar su propio daño oxidativo, igual a lo observado en otras interacciones con áfidos (Zhu-Salzman et al., 2004). Sin embargo, según Divol et al. (2005), las respuestas dentro del floema aparecen a favor de la detoxificación, como observamos en nuestro estudio *M. tanajoa* induce la expresión de enzimas antioxidantes glutaredoxinas y catalasas, las cuales tienen un papel importante en la detoxificación de ROS.

Otras proteínas que inducen la defensa de plantas son los inhibidores de proteínasa, las cuales son inducidas por ataque de herbívoros y obstaculizan la acción digestiva de proteínas presentes en el intestino del artrópodo (Koiwa & Bressan, 1997; Li et al., 2002; Kant et al., 2004). Dentro de las proteínas que se activan está el PI-GGPS (at4g36810) el cual se expresó en el material 60444 durante la interacción con el ácaro verde (Tabla suplementaria 16) pero no en el material NAT-31 sin implicar esto su posible rol en defensa. Este tipo de ataques observados en la mosca blanca y los ácaros activan la vía del ácido salicílico (SA) (Walling, 2000; Kant et al., 2004; De Vos et al., 2005). En este estudio el ácaro verde produjo dos respuestas de defensa diferentes según el genotipo de yuca (NAT31 – 60444). El gen *GGPS* produce el precursor del homoterpeno volátil (E,E)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (TMTT), el cual atrae enemigos naturales, depredadores de ácaros (Kant et al., 2004), este gen es inducido por JA, y necesita un nivel basal de SA para su inducción (Amente et al., 2006). Sarmiento et al. (2011) reportan que el



ácaro polífago *T. evansi* presenta altas oviposición y sobrevivencia de adultos sobre plantas que fueron previamente atacadas por coespecíficos y después sobre plantas no dañadas. Estas características coinciden con plantas que tienen baja actividad de PI. Esto puede indicar que constitutivamente, los genes de “house-keeping”, y los niveles PI son diferencialmente regulados y dependientes de JA, los cuales inducen niveles de PI (O'Donnell et al., 2003). Todo esto sugiere que *T. evansi* reduce constitutivamente las defensas del hospedero. Probablemente una estrategia similar estaría haciendo *M. tanajoa* sobre el genotipo “susceptible” 60444. Otro punto clave, es que este gen no se expresó en NAT31, que generó un mecanismo de defensa diferente. Es necesario validar este tipo de genes para confirmar la hipótesis propuesta.

Un aspecto importante que se establece en este estudio entre los dos materiales seleccionados como resistente y susceptible es la gran “plasticidad fenotípica” que presentan, y la plasticidad definida como independiente de antagonista o mutualista, cuando individuos de dos especies interactúan en una comunidad, una pareja puede ajustar su fenotipo en respuesta a su respectiva pareja. Cuando se evalúa la plasticidad en términos de defensas inducidas directas e indirectas puede influenciar interacciones dentro de organismos a lo largo de diferentes comunidades. Para poder entender las interacciones ecológicas y los mecanismos de defensa contra el ataque de herbívoros es necesario conocer la forma de inducción del herbívoro, el mecanismo de producción de volátiles y su percepción a diferentes niveles. Durante las interacciones complejas entre las plantas y los artrópodos se presenta una percepción por parte de la planta mediante patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMP) en respuesta a inductores específicos (Felton & Tumlinson, 2008; Mithofer & Boland, 2008). Mediante estos HAMP las plantas pueden iniciar el mecanismo de señalización dentro de la planta según el ataque específico del herbívoro (Kessler & Baldwin, 2001) y por último se da por parte de la planta la emisión de compuestos defensivos (volátiles y no volátiles) después del ataque del herbívoro localmente y sistemáticamente.

Karñho-Betancourt y Núñez-Farfán (2015) en su hipótesis de “trade-off” para la evolución de resistencia y tolerancia a herbívoros sugieren que la resistencia puede desarrollarse

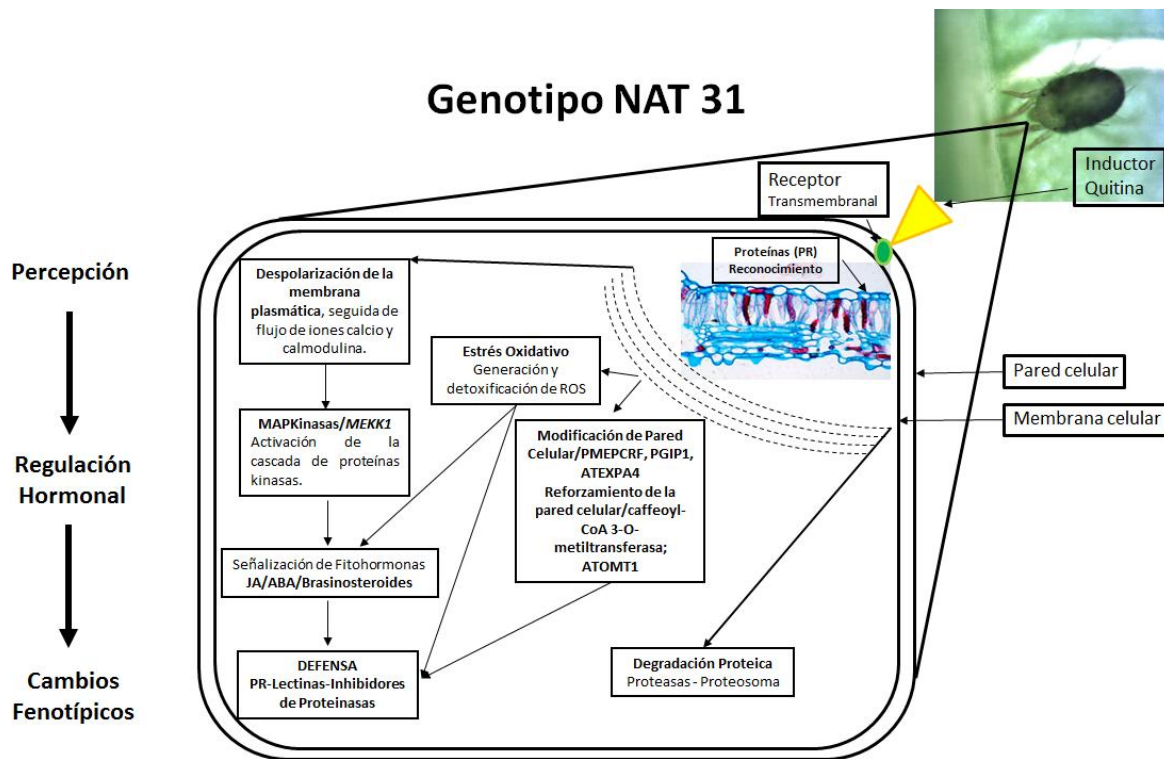
independientemente de la tolerancia de la planta en las poblaciones de la hierba anual, *D. stramonium*, a su vez que la densidad de tricomas es un componente de resistencia heredable y los patrones de selección pueden favorecer los individuos que tiene altos niveles de tricomas en las hojas. En nuestro estudio con yuca podría estar sucediendo el mismo fenómeno, ya que el material NAT31 presenta una alta densidad de tricomas en sus hojas. Éstos han sido fuertemente implicados en defensa contra herbívoros, ya que son extremadamente variables en cuanto a forma y estructura (Johnson, 1975) y su función anti-herbivoría ha sido muy bien documentada dentro y entre especies (Levin, 1973; Agren & Schemske, 1993; Mauricio & Rausher, 1997; Loe et al., 2007). Además los tricomas tienen un papel eco-fisiológico, ya que reducen la exposición de la hoja a la luz ultravioleta y a la pérdida de agua (Ehleringer et al., 1976), a su vez esto genera daño en el comportamiento y desarrollo del herbívoro (Agrawal et al., 2009). Esta pubescencia en las hojas ha sido asociada evolutivamente con metabolitos secundarios en un solo estado ontogénico (Agrawal & Fishbein, 2008). Valdría la pena evaluar en yuca esta hipótesis que contempla una respuesta evolutiva y el entendimiento de los mecanismos de resistencia, es necesario tener en cuenta que se debe definir las características para un material resistente o tolerante desde el punto de vista fenotípico y genotípico, ya que cualquiera de estos dos mecanismos de resistencia puede cumplir un papel especializado para diferentes herbívoros o jugar otros papeles en adición para defensa contra herbívoros, además los estudios en donde se evalúa la evolución de resistencia o tolerancia a la herbivoría puede tener limitaciones durante las interacciones ecológicas con otras plagas o patógenos de plantas, enemigos naturales, relaciones simbióticas y múltiples factores abióticos (Stowe et al., 2000; Lankau & Stratuss, 2008).

En términos generales se puede concluir que el material 60444 en ciertos procesos biológicos (señalización y estrés oxidativo) se duplica y, en otros (proteólisis, metabolismo secundario, biosíntesis y modificación de pared celular, MAPKinasas, metabolismo de hormonas) triplica el número de proteínas cuando se compara con NAT31. Mientras que las proteínas PR (genes de resistencia o de reconocimiento) presentan el mismo número para los dos materiales. Otro aspecto importante es que solamente el material 60444 regula proteínas relacionadas con factores de transcripción, mientras que NAT31 regula proteínas

relacionadas con reconocimiento (genes R). Es necesario realizar más experimentos para tratar de entender la posible supresión de estos genes de reconocimiento/resistencia.

#### **4.1 Modelo hipotético propuesto para NAT31**

El primer paso de la interacción es el contacto que hace el ácaro verde *M. tanajoa* con las hojas del genotipo NAT31, en este momento un receptor de la planta reconoce la presencia del artrópodo, el segundo paso es cuando este se alimenta introduciendo su estilete y un inductor derivado del artrópodo (un/unos componentes salivares y/o quitina) son reconocidos por un receptor en la planta. Al parecer para el caso del genotipo NAT31 no se inducen factores de transcripción, la quitina origina la cascada de señalización mediante la despolarización de la membrana plasmática, flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina después son activadas las cascadas de señalización por MAP quinasas y la subsecuente inducción de las vías de fitohormonas como JA/ABA los cuales a su vez inducen genes de defensa como las proteínas vacuolares básicas *PRB1*, *CHIB (PR-3)*, además de lectinas e inhibidores de proteinasas, los cuales envenenan al artrópodo, pueden tener como blanco los componentes del intestino del artrópodo que contienen carbohidratos, inhiben la acción de sus proteasas impidiendo que digieran bien el alimento, muriendo de desnutrición. La respuesta de defensa es compleja y abarca todos los procesos del metabolismo celular, algunos de los cuales en sí mismos pueden ser mecanismos efectores que estén controlando al atacante. Entre estos se encuentra la generación de ROS, la cual produce enzimas que pueden afectar la dieta del artrópodo o inducir las vías de señalización de fitohormonas mencionadas arriba. La modificación de pared celular, la cual puede dificultar la alimentación del artrópodo y puede también mediar la respuesta de defensa regulada por JA/ET y por último la maquinaria de degradación proteica en la cual se encuentran diversas proteasas con diferentes papeles algunos implicados en defensa contra patógenos. Al mismo tiempo la planta reprime (flechas punteadas en la figura 20) su metabolismo primario y la fotosíntesis, reasignando los recursos de C y N hacia la defensa.

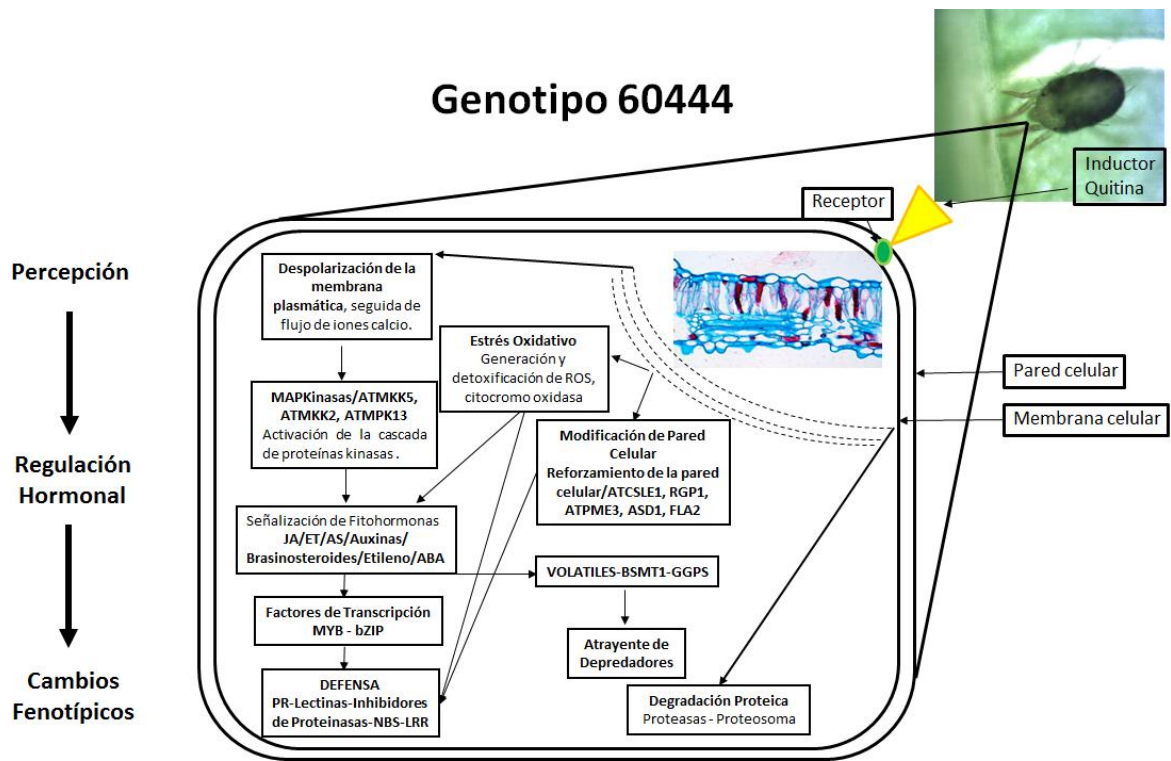


**Figura 20.** Modelo hipotético del mecanismo de respuesta propuesto para el genotipo NAT31.

#### 4.2 Modelo hipotético propuesto para 60444

El primer paso de la interacción es el contacto que hace el ácaro verde *M. tanajoa* con las hojas del genotipo 60444, en este momento un receptor (quitina) de la planta reconoce la presencia del artrópodo, el segundo paso es cuando este se alimenta introduciendo su estilete y un inductor derivado del artrópodo (un/unos componentes salivares y/o quitina) son reconocidos por un receptor en la planta. En el caso de la quitina, está comprobado que la familia de factores de transcripción (TF) *AP2/ERF* son inducidos por este oligosacárido componente del exoesqueleto de los insectos. A su vez este TF es inducido por la cascada de señalización que empieza con la despolarización de la membrana plasmática y flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , después son activadas las cascadas de señalización por MAP quinasas y la subsecuente inducción de las vías de fitohormonas como SA, JA/ET, además se activa las auxinas y los brasinoesteroides. Se ha probado que TF de la familia *AP2/ERF* son los potenciales mediadores del proceso de inducción sinérgica entre JA y ET, los cuales a su

vez inducen genes de defensa como las proteínas vacuolares básicas *PRB1*, *CHIB (PR-3)*, además de lectinas e inhibidores de proteinasas, los cuales envenenan e intoxican al artrópodo, pueden tener como blanco los componentes del intestino del artrópodo que contienen carbohidratos, inhiben la acción de sus proteasas impidiendo que digieran bien el alimento, muriendo de desnutrición. La respuesta de defensa es compleja y abarca todos los procesos del metabolismo celular, algunos de los cuales en sí mismos pueden ser mecanismos efectores que estén controlando al atacante. Entre estos se encuentra la generación de ROS, la cual produce enzimas que pueden afectar la dieta del artrópodo o inducir las vías de señalización de fitohormonas mencionadas arriba (Ver figura 21). La modificación de pared celular, la cual puede dificultar la alimentación del artrópodo y puede también mediar la respuesta de defensa regulada por JA/ET y por último la maquinaria de degradación proteica en la cual se encuentran diversas proteasas con diferentes papeles algunos implicados en defensa contra patógenos. La planta utiliza diversas estrategias para reprimir el ataque como: 1. Producción de compuestos volátiles para atraer enemigos naturales depredadores de ácaros, 2. Reforzar la pared celular, 3. Genes relacionados con citocromo oxidasa. Este tipo de modelos es similar al reportado por Bohórquez (2009), aunque muy general, es necesario realizar experimentos detallados y validación de genes para sugerir un modelo con hipótesis estructuradas y concretas. Para este estudio el modelo general planteado muestra diferencias entre dos genotipos de yuca, es un buen comienzo para continuar con más trabajos.



**Figura 21.** Modelo hipotético del mecanismo de respuesta propuesto para el genotipo 60444.

## 5 CONCLUSIONES

Este es el primer análisis proteómico cuantitativo global llevado a cabo en tejido fotosintético durante el ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) a yuca (*Manihot esculenta*), obteniendo la mayor cobertura detectada hasta el momento, generando un mapa de proteínas para el tejido fotosintético en esta planta. Con esta información proteómica se puede entender mejor la función de las proteínas, la respuesta y las vías involucradas en el mecanismo de defensa que usa yuca ante el ataque del ácaro verde. Con las proteínas identificadas podemos proponer una hipótesis relacionada con la forma cómo el genotipo resistente NAT31 y el “susceptible” 60444 responden al ataque del ácaro verde. Es posible que durante la interacción de yuca – ácaro verde, el reconocimiento se dé a través de un inductor proveniente del artrópodo, el cual puede ser por contacto con un/unos componentes de la saliva o un PAMP como la quitina. Receptores en la yuca reconocerían estos inductores y dispararían la respuesta de defensa. Las proteínas obtenidas permiten sugerir la participación de cascadas de MAPK, señalización guiada por calmodulina y flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, la generación y detoxificación de ROS, los cuales como ya se mencionó, generan productos que pueden actuar como agentes antimicrobianos. Posteriormente, la respuesta de defensa prosigue con la inducción de biosíntesis de las fitohormonas JA, ET, AS, auxinas y brasinoesteroides para el genotipo 60444 y JA, ABA, brasinoesteroides para NAT31, las cuales actúan sinérgicamente y son reguladas y señalizadas corriente arriba por CEV1 y corriente abajo por factores de transcripción como AP2/ERF. Finalmente este factor de transcripción activa los genes de defensa, proteínas relacionadas con patogenicidad como las isoformas básicas de PR-1 y PR-3 (quitinasa), así como lectinas. La hormona JA induce la expresión de PI como cistatina. Para ambos genotipos, pero más para 60444 la remodelación de pared celular surge como potencial respuesta de defensa contra el ácaro verde, además de su posible papel en mediar esta respuesta regulada por JA/ET (Ellis & Turner 2001). El hallazgo de genes como la celulosa sintasa CEV1, las expansinas, la caffeoyl, y las pectinas metilesterasas apoyan esta hipótesis. En términos generales este tipo de ácaro verde tiene un patrón de comportamiento similar a muchos artrópodos reportados hasta el momento en la literatura, para el caso de yuca la diferencia está dada en la gran plasticidad de los

genotipos de yuca (NAT31 y 60444), expresada en la forma como interactúan cada uno con el ácaro, la cual es diferente, al igual que su respuesta de defensa. La estrategia empleada en el análisis proteómico de comparar el genotipo resistente (NAT31) infestado contra el mismo sin infestar, al igual que el “susceptible” 60444 arrojó los mejores resultados, ya que con esta estrategia se encontraron diferencias entre los genotipos en cuatro categorías funcionales (hormonas de señalización, genes R y proteínas PR, factores de transcripción) y la mayoría de proteínas relacionadas con procesos biológicos como respuesta de defensa, incluidos los genes involucrados en biosíntesis, regulación y señalización de JA, ET y AS. Lo que nos indica que en este estudio con esta estrategia ómica se puede detectar los cambios en la fisiología de la planta ante el ataque del ácaro verde, al igual que los cambios cuando la comparación es a nivel del genotipo (resistente contra el susceptible, ambos infestados). Existen serias diferencias entre el material NAT31 y 60444, en casi todas las vías 60444 duplica o triplica el número de genes inducidos cuando se compara con NAT31, se podría decir que existe una estrecha relación entre los mecanismos de defensa que emplea el material 60444, con el número de genes y su intensidad. Por el contrario el carácter resistente del material NAT31 hace que su expresión de genes y su genética resista al ataque y no exhiba todo su arsenal para defenderse del ataque del ácaro verde o por el contrario su arsenal está desplegado constitutivamente y por tal razón es más resistente y no requiere la inducción de genes relacionados con defensa lo que si le sucede al material 60444. A nivel fenotípico la respuesta a libre escogencia y no libre escogencia para los dos genotipos fue bien diferente y contrastante, la preferencia de oviposición en los tres experimentos fue mayor para el material 60444 que para NAT31, concluyéndose que 60444 era altamente susceptible y NAT31 tenía cierto nivel de resistencia al ácaro verde. Mientras que los resultados proteómicos mostraron otro ángulo de la interacción, para el caso del material 60444 expresó varios posibles mecanismos de defensa como estrategia para responder al ataque del ácaro verde. Este genotipo mostró una respuesta de defensa inducida la cual no fue suficiente para resistir y superar el ataque del ácaro. Es necesario ampliar el estudio y hacer trabajos más detallados a nivel fenotípico. En el campo el ataque del ácaro verde a yuca genera una pérdida del área foliar, lo que conlleva a disminución en la capacidad fotosintética y, por tal razón, una mala formación de raíz. Por esta razón el ácaro verde puede llegar a convertirse en un riesgo eminente en los países en desarrollo



como Colombia, en donde yuca es un alimento básico. En términos generales existe una buena asociación entre el ataque del ácaro verde y la modelación (regulación) de proteínas detectado mediante el análisis proteómico. Es necesario continuar con la validación de las proteínas detectadas como claves, con el fin de desarrollar biomarcadores para selección asistida por marcadores moleculares para resistencia a plagas y validar genes para entender vías de señalización y rutas metabólicas que expliquen los posibles mecanismos de defensa a profundidad y las teorías propuestas en este estudio.

## **6 PERSPECTIVAS**

### **6.1 Validación de las proteínas mediante “Western blot”**

Es necesario validar mediante análisis de “Western blot” una serie de proteínas de varias rutas metabólicas y vías de señalización que se modularon diferencialmente durante la interacción entre yuca y el ácaro verde con el fin de obtener una cuantificación absoluta de las proteínas. También se debe aplicar la técnica de PCR en tiempo real para validación de estos genes candidatos. Estas técnicas son altamente sensibles y pueden hacerse análisis cuantitativos de forma que sería posible estudiar la expresión de los genes diferencialmente expresados a través del tiempo.

### **6.2 Identificación y caracterización de inductores en la cascada de señalización del ácaro verde**

Con este trabajo podemos especular sobre la capacidad que tiene el ácaro verde para inducir una o múltiples respuestas de sus hospederos. Hoy en día es clara la importancia de las proteínas salivares, como la inducción de metabolitos secundarios para la atracción de depredadores, influyendo en inducir o suprimir las respuestas de defensa de las plantas, pero se desconoce la naturaleza bioquímica de los inductores de estos en artrópodos. Es necesario complementar los estudios con análisis transcriptómicos e interactómicos para caracterizar bioquímicamente dicha interacción de forma más controlada.

### **6.3 Identificación y caracterización funcional de la señalización de defensa en la yuca ante el ataque del ácaro verde**

Complementario a los estudios anteriores, estarían los tendientes a explorar la complejidad de toda la red de señalización de defensa en la planta. Aunque se conoce que existe una oscilación entre las vías reguladas por SA y JA, los mecanismos integrativos con otras vías de señalización durante la interacción planta-artrópodo no han sido aún identificados. Este

tipo de abordaje podría hacerse con ayuda de la biología de sistemas para entender interacciones de tipo artrópodos.

### **6.3.1 Confirmación de los datos proteómicos obtenidos bajo condiciones de invernadero en campo**

Es necesario evaluar los mismos genotipos bajo condiciones de campo y analizar la respuesta mediante el análisis proteómico. Una vez establecida las proteínas candidatas que presentan un comportamiento similar entre condiciones de invernadero y de campo validarlo mediante transformación genética.

## **6.4 Validación de genes mediante transformación genética**

Se busca entender las vías de señalización y las rutas metabólicas que se encienden y apagan durante la interacción de yuca con el ácaro verde, uno de los futuros alcances será validar esos genes mediante transformación genética creando “knock-out”. Es necesario evaluar esas plantas transformadas tanto en invernaderos como en campo bajo condiciones controladas.

### **6.4.1 Silenciamiento de genes**

Una de las estrategias ampliamente utilizadas en los últimos años es el silenciamiento de genes, básicamente consiste en la infección por virus a las plantas la cual puede activar un mecanismo de defensa mediado por ARN, lo que resulta en una progresiva disminución del virus en las células. Este tipo de silenciamiento es un mecanismo relacionado con un silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) en el cual, la célula detecta la presencia de ARN de cadena doble (ARNdc) y activa su degradación. Esta estrategia busca aprovechar la activación de SGPT por ARNdc para realizar silenciamiento génico.

La estrategia es inserta un gen de interés en el virus (por ejemplo, un gen relacionado con defensa-inhibidores de proteasa), de forma que el ARN cargado al virus puede inducir

silenciamiento de genes homólogos a través de SGPT en la célula hospedera. Varios autores han utilizado este procedimiento para construir virus vectores (Tijsterman et al., 2002; Angell & Baulcombe, 1997).

#### **6.4.1.1 Silenciamiento y sobreexpresión de genes relacionados con atracción de enemigos naturales**

Se generarían plantas transgénicas con el gen BSMT1 (S-adenosil metionina) silenciando y sobre expresando el gen para evaluar los posibles enemigos naturales para el ácaro verde. Bajo condiciones controladas en invernadero se haría el diseño del experimento para garantizar una buena evaluación.

#### **6.4.1.2 Silenciamiento y sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta hipersensible**

Evaluar plantas transgénicas con los genes serina-tipo carboxipeptidasa; DEGP1; serina-tipo endopeptidasa y subtilasa mediante silenciamiento y sobreexpresión de estos genes para evaluar el grado de respuesta hipersensible ante el ataque del ácaro verde y la posible conexión de la vía del proteosoma en la respuesta de defensa.

#### **6.4.1.3 Silenciamiento y sobreexpresión de genes relacionados con el reforzamiento de pared celular**

Evaluar plantas transgénicas con los genes: caffeoyl-CoA 3-O-metiltransferasa; ATOMT1 (o-metiltransferasa 1); ATCSLE1; celulosa sintasa; pectato liasa; MUR1 (murus 1); GDP-manosa 4,6-dehidratasa; RGP1 (reversibilidad glicosilato polipéptido 1); celulosa sintasa; (1-4)-beta-mannan endohidrolasa; pectinesterasa; citidililtransferasa; ATPME3; pectinesterasa; ASD1 (alfa-l-arabinofuranosidasa 1); alfa-N-arabinofuranosidasa/hidrolasa; FLA2 (fasciclina-ligada arabinogalactano 2). Desarrollar silenciamiento y sobreexpresión de estos genes relacionados con el reforzamiento de la pared celular.

#### **6.4.1.4 Silenciamiento y sobreexpresión de genes relacionados con el reconocimiento**

Generar plantas transgénicas con el gen receptor transmembranal, mediante silenciamiento y sobreexpresión para evaluar la posible relación con la respuesta de señalización MAPKinasas y calmodulina.

#### **6.4.1.5 Silenciamiento y sobreexpresión de genes relacionados con resistencia**

Generar plantas transgénicas con los genes: clase NBS-LRR, proteína de familia de resistencia a enfermedad/familia de proteína LRR, endoquitinasa acidica, mediante el silenciamiento y sobreexpresión para evaluar su relación con resistencia al ácaro verde.

#### **6.4.2 Genética reversa**

Con este tipo de estrategia se busca establecer el punto exacto en las cascadas de señalización en donde son determinantes la respuesta de defensa y establecer fenotípicamente alguna modificación en su ausencia (aumento de atracción de enemigos naturales, aumento o pérdida de la resistencia). Mediante la transformación genética en yuca, se podrían generar líneas mutantes empleando la técnica de “knock-out”. Este tipo de transformación consiste en generar plantas transgénicas con transposones, y la correspondiente caracterización y aislamiento de un único mutante estableciéndose una relación entre el genotipo y fenotipo de líneas mutantes y silvestres.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, H., Ohnishi, J., Narusaka, M., Seo, S., Narusaka, Y., Tsuda, S., Kobayashi, M. 2008. Function of jasmonate in response and tolerance of *Arabidopsis* to thrip feeding. *Plant Cell Physiology* 49(1): 68-80.

Adio, A., Casteel, C.L., De Vos, M., Kim, J.H., Joshi, V., Li, B., Juéry, C., Daron, J., Kliebenstein, D.J., Jander, G. 2011. Biosynthesis and defensive function of nactylornithine, a jasmonate-induced *Arabidopsis* metabolite. *Plant Cell* 23: 3303–3318.

Adie, B., Chico, J.M., Rubio-Somoza, I., Solano, R. 2007. Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal Plant Growth Regulation* 26:160-177.

Agrawal, A.A., Heil, M. 2012. Synthesizing specificity: multiple approaches to understanding the attack and defense of plants. *Trends Plant Science* 17: 239–242.

Agrawal, A.A. 2011. Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology* 25:420–432.

Agrawal, A.A., Fishbein, M., Jetter, R., Salminen, J.P., Goldstein, J.B., Freitag, A.E., Sparks, J.P. 2009. Phylogenetic ecology of leaf surface traits in the milkweeds (*Asclepias* spp.): chemistry, ecophysiology, and insect behavior. *New Phytologist* 183: 848–867.

Agrawal, A.A., Fishbein, M. 2008. Phylogenetic escalation and decline of plant defense strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 10057–10060.

Agrawal, A.A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 103–109.

Agrawal, A.A. 2000. Specificity of induced resistance in wild radish: causes and consequences for two specialist and two generalist caterpillars. *Oikos* 89: 493–500.

Agrawal, A., Tuzun, S., Bent, E. 1999. Induced plant defenses against pathogens and herbivores. *Biochemistry, Ecology and Agriculture*. APS Press, St Paul, MN, EEUU, 403 pp.

Agrawal AA, Karban R. 1999. Why induced defences may be favoured over constitutive strategies in plants. In: Tollrian R, Harvell CD (eds) *The ecology and evolution of inducible defenses* Princeton University Press Princeton, N. J., pp 45-61.

Agren, J., Schemske, D.W. 1993. The cost of defense against herbivores: an experimental study of trichome production in *Brassica rapa*. *American Naturalist* 141: 338–350.

Aharoni, A., Jongsma, M.A., Bouwmeester, H.J. 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Science* 10:594–602.

Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H., Tumlinson, J.H. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276:945-949.

Alborn, H.T., Brennan, E.B., Tumlinson, J.H. 2003. Differential activity and degradation of plant volatile elicitors in regurgitant of tobacco hornworm (*Manduca sexta*) larvae. *Journal Chemical Ecology* 29:1357–72.

Ali, J.G., Agrawal, A.A. 2010. Review. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in Plant Science* 17 (5): 1360-1385.

Amente, K., Van Schie, C.C., Bouwmeester, H.J., Haring, M.A., Schuurink, R.C. 2006. Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-

4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta* 224: 1197–1208.

Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazan, K. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460–3479.

Anderson, J.T., Mitchell-Olds, T. 2011. Ecological genetics and genomics of plant defences: evidence and approaches. *Function Ecology* 25: 312–324.

Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 55:373–99.

Arias, B. 1995. Estudio sobre el comportamiento de la “Mosca Blanca” *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) en diferentes clones de yuca *Manihot esculenta* Crantz. Tesis de MSc. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Palmira-Colombia.

Arias, B., Guerrero, J. 2000. Control de plagas de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por resistencia varietal. Memorias XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. SOCOLEN. Medellín - Colombia, Julio 26-28 de 2000. Pp. 243-259.

Arimura, G.I., Kost, C., Boland, W. 2005. Herbivore induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta – Lipida et Lipid Metabolism* 1734: 91–111.

Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., Höfte, M. 2008. Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant Microbe Interaction* 21: 709–719.



Bae, M.S., Cho, E.J., Choi, E.Y., Park, O.K. 2003. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant Journal* 36:652–63.

Baginsky, S. 2009. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrom Review* 28:93–120.

Balagopalan, C. 2002. Cassava utilization in food, feed and industry. *In*: Hillocks, J., Thresh, J., Bellotti, A. (Eds.), *Cassava: biology, production and utilization*. CABI Publishing, Oxon, Reino Unido, pp. 301–318.

Ballare, C.L. 2011. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends Plant Science* 16: 249–257.

Bellotti, A.C., Herrera, C.L., Hernandez, M.P., Arias, B., Guerrero, J.M., Melo, E.L. 2012. Cassava Pests in Latin America, Africa and Asia. *In* R.H. Howeler, ed. *The Cassava Handbook –A reference manual based on the Asian regional cassava training course, held in Thailand*. Cali, Colombia, CIAT. pp. 199-257.

Bellotti, A.C., Herrera, C.L., Hernandez, M.P., Arias, B., Guerrero, J.M., Melo, E.L. 2010. Three major cassava pests in Latin America, Africa and Asia. *In* R.H. Howeler, ed. *A new future for cassava in Asia: Its use as food, feed and fuel to benefit the poor*. Proc. 8th regional workshop, held in Vientiane, Lao PDR. Oct. 20-24, 2008. pp. 544-577.

Bellotti, A. 2008. Cassava pest and their management. *Encyclopedia of Entomology*. *In*: J.L. Capinera, Kluwer, Dordrecht.

Bellotti, A. 2002. Arthropod pests. *In*: Hillocks, J.M., Thresh, J.M., Bellotti, A.C. (Eds.), *Cassava: biology, production and utilization*. CABI Publishing, Oxon, Reino Unido pp. 209–235.

Bellotti, A., Arias B., Vargas, V., Reyes H., Guerrero, J. 2002. Insectos y ácaros dañinos a la yuca y su control. In B. Ospina & H. Ceballos, eds. *La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*, CIAT Publicación No. 327, pp. 160-203. Cali, Colombia.

Bellotti, A. 2000. Las plagas principales del cultivo de la yuca: un panorama global. Memorias XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN Medellin, Colombia, Julio 26-28 2000. Pp 189-217.

Bellotti, A., Smith, L., Lapointe, S. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Annual Review of Entomology* 44: 343–370.

Bellotti, A., Riis, L. 1994. Cassava cyanogenic potential and resistance to pests and diseases. *Acta Horticulturae*. 375: 141-145.

Bellotti, A., Braun, A., Arias, B., Castillo, J., Guerrero, J. 1994. Origin and management of Neotropical cassava arthropod pests. *African Crop Science Journal* 2: 407–417.

Bellotti, A., Reyes, J., Vargas, O., Arias, B., Guerrero, J. 1983a. Descripción de las plagas que atacan la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y características de sus daños. CIAT, Cali. Colombia. Serie 04SC-04.02. 51p.

Bellotti, A., Kawano, K. 1983b. Mejoramiento para resistencia varietal en el cultivo de la yuca. In: Domínguez, C. *Yuca: Investigación, producción y utilización*. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali, Colombia. Pp. 171- 193.

Bellotti, A., Vargas, O., Peña, J., Arias, B. 1983c. Pérdidas de rendimiento en yuca causadas por insectos y ácaros. In: Domínguez, C. *Yuca: Investigación, producción y utilización*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT), Cali, Colombia. P. 393-407.

Bellotti, A., Van Schoonhoven, A. 1978a. Mite and insect pests of cassava. *Annual Review of Entomology*. 23: 39-67.

Bellotti, A., Van Schoonhoven, A. 1978b. Cassava pest and their control. CIAT, Cali. Colombia. Series 09EC-2. 71p.

Bellotti, A., Guerrero, J. 1977. Resistencia varietal en yuca contra los ácaros *Tetranychus urticae* y *Mononychellus tanajoa*. *Revista Colombiana de Entomología*. 3-4: 87-91.

Berardini, T. Z., Mundodi, S., Reiser, L., Huala, E., Garcia-Hernandez, M., Zhang, P., Mueller, L.A., Yoon, J., Doyle, A., Lander, G., Moseyko, N., Yoo, D., Xu, I., Zoechler, B., Montoya, M., Miller, N., Weems, D., Rhee, S.Y. 2004. Functional annotation of the *Arabidopsis* genome using controlled vocabularies. *Plant Physiology* 135(2): 745-55.

Berenbaum, M.R., Zangerl, A.R., Nitao, J.K. 1986. Constraints on chemical coevolution: wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* 40: 1215–1228.

Bidart-Bouzat, M.G., Kliebenstein, D. 2011. An ecological genomic approach challenging the paradigm of differential plant responses to specialist versus generalist insect herbivores. *Oecologia* 167: 677–689.

Boaventura, V., Noronha, A., Alves, A. 2006. Oviposição e desenvolvimento do ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) em diferentes espécies de *Manihot*. Generation challenge program (GCP). 32p.

Bodenhause, N., Reymond, P. 2007. Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 20: 1406–1420.

Bohórquez, A. 2009. Aislamiento de secuencias expresadas diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante genómica funcional. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira-Colombia.

Bostock, R.M. 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiology Molecular Plant Pathology* 55:99-109.

Bostock, R.M. 2005. Signal Crosstalk and Induced Resistance: Straddling the line between cost and benefit. *Annual Review Phytopathology* 43:545–80.

Bouche, N., Fromm, H. 2004. GABA in plants: Just a metabolite?. *Trends in Plant Science* 9: 110–115.

Boughton, A.J., Hoover, K., Felton, G.W. 2005. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal Chemical Ecology* 31:2211–16.

Bowers, M., Stamp, N. 1993. Effects of plant-age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. *Ecology* 74, 1778–1791.

Bown, D. P., Wilkinson, H. S., Gatehouse, J. A. 1998. Midgut carboxypeptidase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Enzyme characterization, cDNA cloning and expression. *Insect Biochemical Molecular Biology*. 28, 739–749.

Braam, J. 2005. In touch: Plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* 165: 373–389.

Browse, J. 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review Plant Biology* 60:183–205.

Burbano, M., Carabalí, A., Montoya-Lerma, J., Bellotti, A. 2007. Resistencia natural de especies silvestres de *Manihot* (Euphorbiaceae) a *Mononychellus tanajoa* (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis* y *Phenacoccus herreni* (Hemiptera). Revista Colombiana de Entomología 33 (2): 110–115.

Burbano, M. 2003. Multiplicación de material vegetal de especies silvestres y domesticadas del género *Manihot* y estudio de su resistencia natural a tres plagas del cultivo (*Mononychellus tanajoa*, *Aleurotrachelus sociales*, y *Phenacoccus herreni*) en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa. Trabajo de pregrado. Programa Académico de Biología. Universidad del Valle. Cali-Colombia.

Byrne, D., Guerrero, J., Bellotti, A., Gracen, V. 1982. Yield and plant-growth responses of *Mononychellus* mite resistant and susceptible cassava cultivars under protected Vs infested conditions. Crop Science 22(3): 486-490.

Campos, M.L., Almeida, M.D., Rossi, M.L., Martinelli, A.P., Junior, C., Figueira, A., Rampelotti-Ferreira, F.T., Vendramim, J.D., Benedito, V.A., Peres, L.A. 2009. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. Journal of Experimental Botany 60: 4346–4360.

Carabalí, A., Bellotti, A., Montoya-Lerma, J., Fregene, M. 2009. *Manihot flabellifolia* Pohl, wild source of resistance to the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae). Crop Protection 29 (1): 34-38.

Carabalí, A., Bellotti A., Montoya-Lerma, J., Fregene M. 2010a. *Manihot flabellifolia* Pohl, wild source of resistance to the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae). Crop Protection 29: 34-38.

Carabalí, A., Bellotti, A., Montoya-Lerma, J., Fregene M. 2010b. Resistance to the whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. Journal of Insect Science 10 (170):1-10. 2010.

Carmona, D., Fornoni, J. 2013. Herbivores can select for mixed defensive strategies in plants. New Phytologist 197: 576–585.

Castillo, G., Cruz, L.L., Tapia López, R., Olmedo-Vicente, E., Carmona, D., Anaya-Lang, A.L., Fornoni, J., Andraca-Gómez, G., Valverde, P.L., Núñez-Farfán, J. 2014. Selection mosaic exerted by specialist and generalist herbivores on chemical and physical defense of *Datura stramonium*. PLoS ONE 9: 102478.

Ceballos, H., Fregene, M., Lentini, Z., Puentes, J., Perez, J., Rosero, A., Tofiño, A. 2006. Development and identification of high-value cassava clones. Acta Hortícola 703: 63-70.

Ceballos, H. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. In: CIAT (ed.) La yuca en el tercer milenio. CIAT, Cali. p 586.

Chen, Y., Pang, Q., Dai, S., Wang, Y., Chen, S., Yan, X. 2011. Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. Journal of Plant Physiology 168: 995–1008.

Cheng, S.H., Zhuang, J.Y., Fan, Y.Y., Du, J.H., Cao, L.Y. 2007. Progress in research and development in hybrid rice: a super-domesticated in China. Annuals of Botany 100:959-966.

Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H.M., Cheng, Z., Xie, D., Peng, J. 2009. Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. PLoS Genetic 5: 1000-1040.

Chivasa, S., Ndimba, B.K., Simon, W.J., Robertson, D., Yu, X.L., Knox, J.P. 2002. Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. Electrophoresis 23:1754–65.

CIAT, 2006. Manejo integrado de moscas blancas asociadas al cultivo de la yuca. Proyecto Manejo Integrado Sostenible de Moscas Blancas Como Plagas y Vectores de Virus en los Trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

CIAT, 2004. Annual report: Integrated pest and disease management in major agroecosystems. CIAT, Cali, Colombia. 12-95 p.

CIAT, 2002. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. La yuca en el tercer milenio. Publicación CIAT. Cali, Colombia.

CIAT, 1999. Annual report: Integrated pest and disease management in major agroecosystems. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 136 p.

Cipollini, D., Purrington, C.B., Bergelson, J. 2003. Costs of induced responses in plants. Basic Applied Ecology 4:79–85.

Cock, J. 1985. *Cassava: New potential for a neglected crop*. Westview Press Inc. Boulder, Colorado.

Contreras, E., López, C. 2008. Expresión de dos genes candidatos a resistencia contra la bacteriosis vascular en yuca. Acta Biológica Colombiana 13: 175-188.

Covington, M.F., Maloof, J.N., Staume, M., Kay, S.A., Harmer, S.L. 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. Genome Biology 9:R130.

Cosgrove, D.J. 2000. Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiology and Biochemistry 38(1-2): 109-24.

Creelman, R.A., Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355–381.

Dangl, J.L., Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826–833.

Day, R.B., Okada, M., Ito, Y., Tsukada, K., Zaghouani, H., Shibuya, N., Stacey, G. 2001. Binding site for chitin oligosaccharides in the soy- bean plasma membrane. *Plant Physiology* 126:1162-1173.

De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, S., Gallerani, R., Ceci, R. 2002. Plant-Pis: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research* 30 (1): 347-348.

De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410: 577–80.

De Moraes, C.M., Lewis, W.J., Pare, P.W., Alborn, H.T., Tumlinson, J.H. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393(6685):570-573.

Dervinis, C., Frost, C.J., Lawrence, S.D., Novak, N.G., Davis, J.M. 2010. Cytokinin primes plant responses to wounding and reduces insect performance. *Journal Plant Growth Regulation* 29: 289–296.

De Vos, M., Van Oosten, V., Van Poecke, R., Van Pelt, J., Pozo, M., Mueller, M., Buchala, A., Metraux, J., Van Loon, L., Dicke, M., Pieterse, C. 2005. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (9): 923-937.



Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* 58:497–513.

Dicke, M., Baldwin, I. 2010. The evolutionary context for herbivore induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* 15: 3, 167-175.

Dicke, M., Van Loon, J., Soler, R. 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *National Chemical Biology* 5: 317–324.

Dicke, M., Hilker, M. 2003. Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic and Applied Ecology* 4: 3–14.

Dicke, M., Van Poecke, R.M.P. 2002. *Signalling in plant-insect interactions: signal transduction in direct and indirect plant defence. In D Scheel, C Wasternack, eds. Plant Signal Transduction. Oxford University Press, Oxford, pp 289–316.*

Divol, F., Vilaine, F., Thibivilliers, S., Amselem, J., Palauqui, J-C., Kusiak, C., Dinant, S. 2005. Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Molecular Biology* 57:517–540.

Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., Kazan, K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2225–2245.

Ehleringer, J., Björkman, O., Mooney, H.A. 1976. Leaf pubescence-effects on absorbance and photosynthesis in a desert shrub. *Science* 192: 376–377.

Ehrlich, Paul R.; Raven, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study of coevolution. *Evolution* 18 (4): 586–608.

Ellis, C., Turner, J.G. 2001. The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell* 13: 1025-1033.

Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101: 1781–1785.

Erb, M., Flors, V., Karlen, D., de Lange, E., Planchamp, C., D'Alessandro, M., Turlings, T.C., Ton, J. 2009. Signal signature of aboveground-induced resistance upon belowground herbivory in maize. *Plant Journal* 59: 292–302.

Erb, M., Claudia, T.G., Bruce, Z., Hibbard, E., Ted, C., Turlings, J. 2012. The role of abscisic acid and water stress in root herbivore-induced leaf resistance. *New Phytology* 189: 308–320.

Fairwell, T., Barnes, W.T., Richards, F.F., Lovins, R.E. 1970. Sequence analysis of complex protein mixtures by isotope dilution and mass spectrometry. *Biochemistry* 9 (11): 2260–2267.

FAO. 2012. Food outlook. Global market analysis – November 2012. Rome.

FAO, 2009. FAOSTAT Statistical Databases. Roma, Italia: FAO/FIDA. 2000. *La Economía Mundial de la Yuca: Hechos, Tendencias y Perspectivas*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola, Roma.

FAO, 2007. Marker-Assisted Selection (Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish). *Chapter 7. Marker-assisted selection in common beans and cassava*. Mathew W. Blair, Martin A. Fregene, Steve E. Beebe and Hernán Ceballos. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma.

FAO, 2000. *La economía mundial de la yuca, hechos tendencias y perspectivas*. Roma-Italia. Food & Agriculture Organization of the United Nations 78 p.

Faria, M., Wraight, S. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection* 20 (9): 767-778.

Farmer, E.E. 2001. Surface-to-air signals. *Nature* 411(6839): 854-856.

Fatouros, N.E., Dicke, M., Mumm, R., Meiners, T., Hilker, M. 2008. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behavior Ecology* 19 (3): 677-689.

Fauquet, C., Fargette, D. 1990. African cassava mosaic virus. Etiology, epidemiology and control. *Plant Disease* 74: 404 - 411.

Felton, G.W., Tumlinson, J.H. 2008. Plant–insect dialogs: complex interactions at the plant–insect interface. *Current Opinion Plant Biology* 11: 457–463.

Fermont, A., Van Asten, P., Tittonell, P., Van Wijk, M., Giller, K. 2009. Closing the cassava yield gap: An analysis from smallholder farms in East Africa. *Field Crops Research* 112 (1): 24-36.

Fineblum, W.L., Rausher, M.D. 1995. Trade-off between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory. *Nature* 377:517–520.

Fluhr, R. 2001. Sentinels of disease. Plant resistance genes. *Plant Physiology* 127 (4): 1367- 1374.

Fox, L.R. 1981. Defense and dynamics in plant–herbivore systems. *American Zoologist* 21: 853–864.

Fraenkel, G. 1959. Raison d’être of secondary plant substances. *Science* 129: 1466–1470.

Fregene, M., Morante, N., Sánchez, T., Marín, J., Ospina, C., Barrera, E., Gutiérrez, J., Guerrero, J., Bellotti, A., Santos, L., Alzate, A., Moreno, S., Ceballos, H. 2006. Molecular markers for the introgression of useful traits from wild *Manihot* relatives of cassava; marker-assisted selection of disease and root quality traits. *Journal Root Crops* 32 (1):1–31.

Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S. 1997. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277:696–99.

Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., Rudella, A., Sun, Q. 2004. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16:478–99.

Futuyma, D.J.; Montgomery, S. 1983. *Coevolution*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Futuyma, D.J., Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual Review Ecology Systematic* 19: 207–233.

Futuyma, D.J. Agrawal, A. 2009. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *PNAS* 106 (43): 18054-18061.

Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P. 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 100(12): 6940–6945.

Giavalisco, P., Nordhoff, E., Kreitler, T., Kloppel, K.D., Lehrach, H., Klose, J. 2005. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flightmass spectrometry. *Proteomics* 5:1902–13.

Gilardoni, P., Schuck, S., Jüngling, R., Rotter, B., Baldwin, I.T., Bonaventure, G. 2010. SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses. *BMC Plant Biology* 10: 66.

Giri, A.P., Wunsche, H., Mitra, S., Zavala, J.A., Muck, A. 2006. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome. *Plant Physiology* 142:1621–41.

Giron, D., Kaiser, W., Imbault, N., Casas, J. 2007. Cytokinin-mediated leaf manipulation by a leafminer caterpillar. *Biology Letters* 3: 340–343.

Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology* 43:205–27.

Gomez, M.J. 2004. Caracterización de la resistencia a la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) en genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 103 p.

Gomi, K., Yamasaki, Y., Yamamoto, H., Akimitsu, K. 2003. Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in *Citrus*. *Journal of Plant Physiology* 160: 1219–1131.

Goodspeed, D., Chehab, E., Min-Venditti, A., Braam, J., Covington, M. 2011. Arabidopsis synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 108 (12): 4674-4677.

Gould, F. 1988. Genetics of pairwise and multispecies plant-herbivore coevolution. In: Spencer, KC editor. *Chemical mediation of coevolution*. San Diego: Academic Press. pp. 13–55.

Grant, M.R., Jones, J.D.G. 2009. Hormone (dis) harmony moulds plant health and disease. *Science* 324: 750–752.

Grbic, M., Van Leeuwen T., M. Clark, R., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbic, V., Osborne, E., Dermauw, W., Ngoc, P., Ortego, F., Crespo, P., Diaz, I., Martinez, M., Navajas, M., Sucena, E., Magalhaes, S., Nagy, L., Pace, R., Djuranovic, S., Smagghe, G., Iga, M., Christiaens, O., Veenstra, J., Ewer, J., Villalobos, R., Hutter, J., Hudson, S., Velez, M., Yi, S., Zeng, J., Pires-daSilva, A., Roch, F., Cazaux, M., Navarro, M., Zhurov, V., Acevedo, G., Bjelica, A., Fawcett, J., Bonnet, E., Martens, C., Baele, G., Wissler, L., Rodriguez, A., Tirry, L., Blais, C., Demeestere, K., Henz, S., Gregory, T., Mathieu, J., Verdon, Lou., Farinelli, L., Schmutz, J., Lindquist, E., Feyereisen, R., Van de Peer, Y. 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* 479: 479-493.

Green, T.R., Ryan, C.A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves—possible defense mechanism against insects. *Science* 175:776–77.

Grossmann, J., Roschitzki, B., Panse, C., Fortes, C., Barkow-Oesterreicher, S., Rutishauser, D., Schlapbach, R. 2010. Implementation and evaluation of relative and absolute quantification in shotgun proteomics with label-free methods. *Journal Proteomics* 13: 1740–1746.

Gstaiger, M., Aebersold, R. 2009. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Natural Review Genetics* 10:617–27.

Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Urecek, K., Gelb, M.H., Aebersold, R. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Natural Biotechnology* 17 (10): 999-1004.

Halitschke, R., Gase, K., Hui, D., Schmidt, D.D., Baldwin, I.T. 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. *Plant Physiology* 131:1894–902.

Halkier, B.A., Gershenzon, J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review Plant Biology* 57:303–33.

Hall, D. E., Macgregor, K. B., Nijse, J., Bown, A. W. 2004. Footsteps from insect larvae damage leaf surfaces and initiate rapid responses. *Eur. Journal Plant Pathology* 110:441–447.

Hammond-Kosack, K., Jones, J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds. BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiology 1102–156.

Hare, J.D. 2011. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 56:161-80.

Hartmann, T. 2008. The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 105: 4541–4546.

Haswell, E.S., Peyronnet, R., Barbier-Brygoo, H., Meyerowitz, E.M., Frachisse, J.M. 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. *Current Biology* 18: 730–734.

Hawthorne, D.J., Via, S. 2001. Genetic linkage of ecological specialization and reproductive isolation in pea aphids. *Nature* 412:904–907.

Heil, M. 2009. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science* 14: 356–363.

Heil, M., Ton, J. 2008. Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science*: 13: 264–272.

Helle, W., Overmire, P.J. 1973. Variability in tetranychid mites. *Annual Review Entomology* 18: 97-120.

Herrera, B. 2009. Predicción de distribución potencial de plagas de yuca, utilizando modelos de nicho ecológico. Universidad del Valle, Departamento de Geografía. Decisión y análisis de políticas – CIAT.

Hilker, M., Meiners T. 2010. How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods?. *Biological Reviews* 85: 267-280.

Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., Yu, H. 2010. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Development Cell* 19: 884–894.

Howe, G.A. 2004. Jasmonates as signals in the wound response. *Journal Plant Growth Regulation* 23:223–37.

Howe, G.A., Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review Plant Biology* 59:41–66.

Hui, D.Q., Iqbal, J., Lehmann, K., Gase, K., Saluz, H.P., Baldwin, I.T. 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and



its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiology* 131: 1877–1893.

Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delly, M., Fisseha, M., Blum-Sperisen, S., Kochhar, S., Arigoni, F. 2006. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase like serine proteases. *Journal Biology Chemical* 281(25): 17246-52.

James, P. 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Review Biophysics* 30:279–331.

Jansson, C., Westerbergh, A., Zhang, J., Hu, X., Sun, C. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Applied Energy* 86, Supplement 1: S95-S99.

Jena, K. K., Pasalu, I. C., Rao, Y. K., Varalaxmi, Y., Krishnaiah, K., Khush, G. S., Kochert, G. 2002. Molecular tagging of a gene for resistance to brown planthopper in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 129:81–88.

Johnson, M., Smith, S., Rausher, R. 2009. Plant sex and the evolution of plant defenses against herbivores. *Proceedings National Academy Sciences of USA* 106 (43): 18079-18084.

Johnson, B. 1975. Plant pubescence. An ecological perspective. *Botanical Review* 41: 233–258.

Joanitti, GA., Freitas, SM., Silva, L.P. 2006. Proteinaceous protease inhibitors: Structural features and multiple functional faces. *Current Enzyme Inhibition* 2(3): 199-217.

Jung, C., Lyou, S.H., Yeu, S., Kim, M.A., Rhee, S., Kim, M., Lee, J.S., Choi, Y.D., Cheong, J.J. 2007. Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 26: 1053–1063.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 18:11086-11091.

Kall, L., Storey, J.D., MacCoss, M.J., Noble, W.S. 2008. Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *Journal Proteome Research* 7(1): 29-34.

Kaloshian, I. 2004. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *Journal Chemical Ecology* 30:2419–38.

Kamo, M., Kawakami, T., Miyatake, N., Tsugita, A. 1995. Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16:423–30.

Kant, M.R., Ament, K., Sabelis, M.W., Haring, M.A., Schuurink, R.C. 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology* 135: 483–495.

Kant MR, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC. 2008. Intraspecific variation in a generalist herbivore accounts for differential induction and impact of host plant defences. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences* 275(1633): 443–452.

Karban, R., Baldwin, I. 1997. *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press. 320 p.

Kariñho-Betancourt, E., Núñez-Farfán, J. 2015. Evolution of resistance and tolerance to herbivores: testing the trade-off hypothesis. *Peer Journal* 3:e789; DOI 10.7717/peerj.789.

Kawano, K. 2003. Thirty years of cassava breeding for productivity – biological and social factors for success. *Crop Science*. 43 (4) 1325-1335.

Kessler, A., Baldwin, I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291:2141–44.

Kessler, A., Baldwin, I. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review Plant Biology* 53: 299-328.

Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J. 2005. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433: 167–171.

Klesig, D.F., Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1439-1458.

Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97:8849–55.

Kliebenstein, D., Pedersen, D., Barker, B., Mitchell-Olds, T. 2002. Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 161: 325–332.

Kohler, H., Schwindling, S., Conrath, U. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 128: 1046-1056.

Koiwa, H., Bressan, R. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2 (10): 379-384.

Koller, A., Washburn, M.P., Lange, B.M., Andon, N.L., Deciu, C., Haynes, P.A. 2002. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 99: 11969–74.

Komatsu, S., Kajiwar, H., Hirano, H. 1993. A rice protein library a data-file of rice proteins separated by 2-dimensional electrophoresis. *Theoretical Applied Genetic* 86:935–42.

Koo, A.J.K., Howe, G.A. 2009. The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70: 1571–1580.

Kost C, Heil M. 2008. The defensive role of volatile emission and extrafloral nectar secretion for lima bean in nature. *Journal of Chemical Ecology* 34(1): 2-13.

Krieger, R.I., Feeny, P.P., Wilkinson, C.F. 1971. Detoxication enzymes in the guts of caterpillars: an evolutionary answer to plant defenses?. *Science* 172: 579–580.

Kuussaari, M., Singer, M., Hanski, I. 2000. Local specialization and landscape-level influence on host use in an herbivorous insect. *Ecology* 81:2177–2187.

Kuhn, E., Wu, J., Karl, J., Llao, H., Zolg, W., Guild, B. 2004. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and <sup>13</sup>C-labeled peptide standards. *Proteomics* 4 (4) 1175–1186.

Kunkel, B.N., Brooks, D.M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion Plant Biology* 5:325–31.

Kursar, T., Dexter, K., Lokvam, J., Pennigton, R., Richardson, J., Weber, M., Murakami, E., Drake, C., McGregor, R., Coley, P. 2009. The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 106 (43): 18073-18078.

Lamb, C., Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review in Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 48: 251-275.

Lankau, R.A. 2007. Specialist and generalist herbivores exert opposing selection on a chemical defense. *New Phytologist* 175:176–184.

Lankau, R.A., Strauss, S.Y. 2008. Community complexity drives patterns of natural selection on a chemical defense of *Brassica nigra*. *The American Naturalist* 171: 150–161.

Lawrence, S.D., Novak, N.G. 2006. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. *Biotechnology Letters* 28:593–99.

Levin, D.A. 1973. The role of trichomes in plant defence. *Quarterly Review of Biology* 48: 3–15.

Li, L., Li, C., Lee, G.I., Howe, G.A. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 99: 6416–21.

Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J. 2004. The tomato homolog of coronatine-insensitive1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16:126–43.

Li, Q., Xie, Q.G., Smith-Becker, J., Navarre, D.A., Kaloshian, I. 2006. Mi-1-mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:655–664.

Liu, X., Smith, C., Gill, B. 2002. Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn4* and *Dn6*. *Theoretical Applied Genetics* 104:1042–1048.

Liu, Q., Phoebe, Chen Y.P., Li, J. 2014. K-Partite cliques of protein interactions: A novel subgraph topology for functional coherence analysis on PPI networks. *Journal Theoretical Biology* 340: 146-154.

Løe, G., Torøang, P., Gaudeul, M., Agren, J. 2007. Trichome production and spatiotemporal variation in herbivory in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Oikos* 116: 134–142.

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R. 2004. Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1938–1950.

Lou, Y., Ma, B., Cheng, J. 2005. Attraction of the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* Pang et Wang to rice volatiles induced by the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Journal Chemical Ecology* 31:2357–2372.

Lyuu, S.H., Park, H.J., Jung, C., Sohn, H.B., Lee, G., Kim, C.H., Kim, M., Choi, Y.D., Cheong, J.J. 2008. The *Arabidopsis* AtLEC gene encoding a lectin-like protein is up-regulated by multiple stimuli including developmental signal, wounding, jasmonate, ethylene, and chitin elicitor. *Molecular Cells* 27: 75-81.

Macea, C. 2007. Identificación de marcadores microsatélites asociados con la resistencia al ácaro verde (*Mononychellus tanajoá*) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Trabajo de

grado (Biología). Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Programa Académico de Biología, Santiago de Cali. 92p.

Major, I.T., Constabel, C.P. 2006. Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. *New Phytology* 172:617– 35.

Maleck, K., Dietrich, R.A. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?. *Trends Plant Science* 4(6): 215-219.

Mapes, C.C., Davies, P.J. 2001. Indole-3-acetic acid and ball gall development on *Solidago altissima*. *New Phytology* 151: 195–202.

Maserti, B.E., Del Carratore, R., Della Croce, C.M., Podda, A., Migheli, Q., Froelicher, Y., Luro, F., Morillon, R., Ollitrault, P., Talon, M., Rossignol, M. 2011. Comparative analysis of proteome changes induced by the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* and methyl jasmonate in citrus leaves. *Journal Plant Physiology* 168(4):392-402.

Mauch, F., Kmecl, A., Schaffrath, U., Volrath, S., Goerlach, J., Ward, E., Ryals, J., Dudler, R. 1997. Mechanic sensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. *Plant Physiology* 114: 1561–1566.

Mauch-Mani, B., Mauch, F. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opininn Plant Biology* 8: 409–414.

Mauricio, R., Rausher, M.D. 1997. Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* 51: 1435–1444.

McCall, P.J., Turling, T.C.J., Lewis, W.J., Tumlinson, J.H. 1993. Role of plant volatiles in host location by the specialist parasitoid *Microplitis croceipes* Cresson (Braconidae: Hymenoptera). *Journal Insect Behavior* 6 (5): 625-639.

Mesa, N., Bellotti, A., Duque, M. 1987. Tablas de vida de *Mononychellus progresivus* Doreste y *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) en yuca. *Revista Colombiana de Entomología* 13 (2): 11-22.

Mewis, I., Tokuhsa, J.G., Schultz, J.C., Appel, H.M., Ulrichs, C., Gershenzon, J. 2006. Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways. *Phytochemistry* 67:2450–62.

Mithofer, A., Boland, W. 2008. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology* 146: 825–831.

Mohan, S., Ma, P., Pechan, T., Bassford, E., Williams, W., Luthe, D. 2006. Degradation of the *S. frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. *Journal of Insect Physiology* 52 (1): 21-28.

Molnár, G., Bancos, S., Nagy, F., Szekeres, M. 2002. Characterisation of BRH1, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 127–133.

Moran, P.J., Cheng, Y., Cassell, J.L., Thompson, G.A. 2002. Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant–aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 51: 182–203.

Mori, N., Alborn, H.T., Teal, P.E., Tumlinson, J.H. 2001. Enzymatic decomposition of elicitors of plant volatiles in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *Journal Insect Physiology* 47: 749–757.



Mosolov, V.V., Valueva, T.A. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41(3): 227-246.

Mumm, R., Posthumus, M.A., Dicke, M. 2008. Significance of terpenoids in induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. *Plant Cell Environment* 31 (4): 575-585.

Musser, R.O., Hum-Musser, S.M., Eichenseer, H., Peiffer, M., Ervin, G., Murphy, J.B., Felton, G.W. 2002. Herbivory: Caterpillar saliva beats plant defences a new weapon emerges in the evolutionary arms race between plants and herbivores. *Nature* 416: 599–600.

Nakagawa, Y., Katagiri, T., Shinozaki, K., Qi, Z., Tatsumi, H., Furuichi, T., Kishigami, A., Sokabe, M., Kojima, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Iida, K., Terashima, A., Nakano, M., Ikeda, M., Yamanaka, T., Iida, H. 2007. *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 104: 3639–3644.

Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., Yoshida, S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* 33: 887–898.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J.D.G. 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436–439.

Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., Jones, J.D. 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology* 18: 650–655.

Nhassico, D., Muquingue, H., Cliff, J., Cumbana, A., Bradbury, J.H. 2008. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2043-2049.

Nieminen, M., Suomi, J., Van Nouhuys, S., Sauri, P., Riekkola, M.L. 2003. Effect of iridoid glycoside content on oviposition host plant choice and parasitism in a specialist herbivore. *Journal Chemical Ecology* 29: 823–844.

Norman-Setterblad, C., Vidal, S., Palva, E.T. 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *MPMI* 13 (4): 430–438.

Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., Valverde, P.L. 2007. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 541–566.

Nylin, S., Nygren, G.H., Windig, J.J., Janz, N., Bergstrom, A. 2005. Genetics of host-plant preference in the comma butterfly *Polygonia c-album* (Nymphalidae), and evolutionary implications. *Biological Journal of the Linnean Society* 84:755–765.

O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274:1914–17.

O'Donnell, P.J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J.B. 2003. Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology* 133: 1181–1189.

Okogbenin, E., Porto, M., Egesi, C., Mba, C., Espinosa, E., Santos, L., Ospina, C., Marín, J., Barrera, E., Gutierrez, J., Ekanayake, I., Iglesias, C. Fregene, M. 2008. Marker-assisted

introgression of resistance to cassava mosaic disease into Latin American germplasm for the genetic improvement of cassava in Africa. *Crop Science* 47:1895-1904.

Omongo, C.A., Kawuki, R., Bellotti, A.C., Alicai, T., Baguma, Y., Maruthi, M.N., Bua, A., Colvin, J., 2012. African cassava whitefly, *Bemisia tabaci*, resistance in African and South American cassava genotypes. *Journal Integrative Agriculture* 11 (2): 327-336.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular Cell Proteomics* 1 (5): 376–386.

Onkokesung, N., Gális, I., von Dahl, C.C., Matsuoka, K., Saluz, H.P., Baldwin, I.T. 2010. Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in *Nicotiana attenuata* leaves. *Plant Physiology* 153: 785–798.

Orians, C.M., Pomerleau, J., Ricco, R. 2000. Vascular architecture generates fine scale variation in systemic induction of proteinase inhibitors in tomato. *Journal Chemical Ecology* 26:471–85.

Owiti, J., Grossman, J., Gehrig, P., Dessimoz, C., Beeching, J., Zhang, P., Gruissem, W., Vanderschuren, H. 2008. Analysis of post-harvest physiological deterioration of cassava storage roots and identification of potential candidates for its modulation. Global Cassava Partnership Meeting, July 21 – 25, Ghent, Bélgica. SP08-05.

Owiti, J. 2009. Molecular and biochemical understanding of post-harvest physiological deterioration in cassava roots and approaches for its modulation. Tesis PhD. ETH No. 18521.

Palaniswami, M.S., Pillai, K.S., Nair, R.R., Mohandas, C. 1995. *A new cassava pest in India. Cassava Newsletter* 9(1):6–7.

Panda, N., Khush, G. 1995. Host plant resistance to insects. International Rice Research Institute, Philippines. Pp 431.

Paré, P.W., Tumlinson, JH. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121:325–31.

Parsa, S., Medina, C, Rodríguez, V. 2015. Sources of pest resistance in cassava. *Crop Protection* 68: 79-84.

Paschold, A., Halitschke, R., Baldwin, I.T. 2006. Using ‘mute’ plants to translate volatile signals. *Plant Journal* 45: 275– 291.

Pauwels, L., Inzé, D., Goossens, A. 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean?. *Trends Plant Science* 14: 87–91.

Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.P., Broekaert, W.F. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:2103-2113.

Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E., Willmitzer, L. 1993. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191:123–28.

Peiffer, M., Felton, G.W. 2009. Do caterpillars secrete “oral secretions”? *Journal of Chemical Ecology* 35: 326–335.

Peumans, W.J., Vandamme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109:347–52.

Pichersky, E. Gershenzon, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 237–243.

Piesik, D., Pan'ka, D., Delaney, K.J., Skoczek, A., Lamparski, R., Weaver, D.K. 2011. Cereal crop volatile organic compound induction after mechanical injury, beetle herbivory (*Oulema* spp.), or fungal infection (*Fusarium* spp.). *Journal Plant Physiology* 168: 878–886.

Piesik, D., Pánka, D., Jeske, M., Wenda-Piessik, A., Delaney, K.J., Weaver, D.K. 2012. Volatile induction of infected and neighbouring uninfected plants potentially influence attraction/repellence of a cereal herbivore. *Journal of Applied Entomology* 1-12.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M. 2009. Networking by smallmolecules hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5:308-316.

Podda, A., Simili, M., Del Carratore, R., Mouhaya, W., Morillon, R., Maserti, B.E. 2014. Expression profiling of two stress-inducible genes encoding for miraculin-like proteins in citrus plants under insect infestation or salinity stress. *Journal of Plant Physiology* 171 (1): 45-54.

Poelman, E.H., Galiart, R.J.F.H., Raaijmakers, C., Van Loon, J., Van dam, M. 2008. Performance of specialist and generalist herbivores feeding on cabbage cultivars is not explained by glucosinolate profiles. *Entomology Experimental et Applicata* 127: 218–228.

Pozo, M.J., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. 2004. Jasmonates—signals in plant-microbe interactions. *Journal Plant Growth Regulation* 23: 211–222.

Quisenberry, S.S., Clement, S.L. 2002. Conservation and use of global plant genetic resources for insect resistance. *Journal Agriculture Research* 53:865–872.

Rabilloud, T., Lelong, C. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal Proteomics* 74:1829–41.

Ralph, S., Oddy, C., Cooper, D., Yueh, H., Jancsik, S. 2006. Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Molecular Ecology* 15:1275–97.

Rampitsch, C., Bykova, N.V. 2012. The beginnings of crop phosphoproteomics: exploring early warning systems of stress. *Front Plant Science* 3:144.

Rasmann, S., Kollner, T.G., Degenhardt, J., Hiltpold, I., Toepfer, S. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434:732–37.

Rasmann, S., Turlings, T.C.J. 2007. Simultaneous feeding by aboveground and belowground herbivores attenuates plant-mediated attraction of their respective natural enemies. *Ecology Letters* 10(10): 926-936.

Rausher, M.D. 2001. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411: 857–864.

Rausher, M.D. 1992. The measurement of selection on quantitative traits: biases due to environmental covariances between traits and fitness. *Evolution* 46:616–626.

Reymond, P., Farmer, E.E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion Plant Biology* 1:404-411.

Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:707–19.

Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M., Krishnamurthy, V., Dicke, M., Farmer, E.E. 2004. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* 16:3132–47.

Rogers, D., Appan, S. 1973. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A computer Assisted Study (Hafner, New York).

Rojo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G., Sanchez-Serrano, J.J. 1998. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 13:153– 165.

Rojo, E., Solano, R., Sanchez-Serrano, J.J. 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal Plant Growth Regulation* 22: 82–98.

Rosenthal, J.P., Kotanen, P.M. 1994. Terrestrial plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 145–148.

Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Pappin, D.J. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular Cell Proteomics* 3: 1154–1169.

Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review Phytopathology* 28:425–49.

Saito, T., Tabata, K., Kohno, S. 1983. Mechanisms of acaride resistance with emphasis on dicofol. In: Pest resistance to pesticides, ed. G.P. Geor-Ghiou & T. Saito. Plenum Publ. Corporation, EEUU. pp. 429-444.

Sano, H., Seo, S., Koizumi, N., Niki, T., Iwamura, H., Ohashi, Y. 1996. Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant Cell Physiology* 37: 762–769.

Santamaria, M., Thomson, C.J., Read, N.D., Loake, G.J. 2001. The promoter of a basic *PRI*-like gene, *AtPRB1*, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate. *Plant Molecular Biology* 47: 641–652.

Sarmiento, R., Lemos, F., Bleeker, P., Schuurink, R., Pallini, A., Oliveira, M., Lima, E., Kant, M., Sabelis, M., Janssen, A. 2011. A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters* 14: 229–236.

Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, X., Ohta, H., Tabata, S. 2001. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Research* 8: 153–161.

Sasaki-Sekimoto, Y., Taki, N., Obayashi, T., Anono, M., Matsumoto, F. 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 44: 653–668.

Schafer, M., Fischer, C., Meldau, S., Seebald, E., Oelmüller, R., Baldwin, I.T. 2011. Lipase activity in insect oral secretions mediates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156: 1520–1534.

Schaller, F., Schaller, A., Stintzi, A. 2005. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal Plant Growth Regulation* 23:179–99.



Schaller, F., Weiler, E.W. 2002. Wound- and mechanical signalling. In Plant Signal Transduction (eds. D. Scheel and C. Wasternack). pp. 20–44. Oxford University Press, Oxford.

Schaller, A. 2008. Induced plant resistance to herbivory. Berlin: Springer-Verlag. 435 p.

Schilmiller, A., Howe, G. 2005. Systemic signaling in the wound response. Current Opinion in Plant Biology 8 (4): 369-377.

Schittko, U., Preston, C.A., Baldwin, I.T. 2000. Eating the evidence? *Manduca sexta* larvae can not disrupt specific jasmonate induction in *Nicotiana attenuata* by rapid consumption. Planta 210:343–46.

Schmelz, E.A., Carroll, M.J., LeClere, S., Phipps, S.M., Meredith, J. 2006. Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. Proceedings of the National Academy of Sciences of EEUU 103: 8894–99.

Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M. 2005. Insect–plant biology. Oxford: Oxford University Press.

Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., Manners, J.M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 97: 11655–11660.

Shan, L.B., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.A., Nürnberger, T., Martin, G.B., Sheen, J. 2009. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. Cell Host Microbe 4: 17–27.

Shepherd, R.W., Bass, W.T., Houtz, R.L., Wagner, G.J. 2005. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. *Plant Cell* 17:2421-2421.

Shibuya, N., Minami, E. 2001. Oligosaccharide signaling for defense responses in plant. *Physiology Molecular Plant Pathology* 59:223-233.

Shonle, I., Bergelson, J. 2000. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* 54: 778–788.

Siemens, J., Nagel, M., Ludwig-Müller, J., Sacristán, M. D. 2002. The interaction of *Plasmodiophora brassicae* and *Arabidopsis thaliana*: Parameters for disease quantification and screening of mutant lines. *Journal Phytopathology* 150:592-605.

Siemens, J., Keller, I., Sarx, J., Kunz, S., Schuller, A., Nagel, W., Schmülling, T., Parniske, M., Ludwig-Müller, J. 2006. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19: 480–494.

Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.Z., Vissers, J.P., Geromanos, S.J. 2006. Absolute quantification of proteins by LCMSE: A virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 144–156.

Sirlin, J. L. 1958. On the incorporation of methionine 35S into proteins detectable by autoradiography. *Journal Histochemical Cytochemical* 6 (3): 185–190.

Skovgard, H., Tomkiewicz, J., Nachman, G., Munster –Swendsen, M. 1993. The effect of the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* on the growth and yield of cassava *Manihot esculenta* in a seasonally dry area in Kenya. *Experimental Applied Acarology* 17: 41-58.

Stamp, N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology* 78: 23–55.

Staswick, P.E., Tiryaki, I. 2004. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2117–27.

Stowe, K.A., Marquis, R.J., Hochwender, C.G., Simms Roy, E.L. 2000. The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 31:565–595.

Stupak, M., Vanderschuren, H., Gruissem, W., Zhang, P. 2006. Biotechnological approaches to cassava protein improvement. *Trends in Food Science & Technology*. 17 (12): 634-641.

Sun, J.Q., Xu, Y., Ye, S., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F., Zhou, W., Chen, R., Li, X., Tietz, O., Wu, X., Cohen, J.D., Palme, K., Li, C. 2009. *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 21: 1495–1511.

Tan, G. X., Weng, Q.M., Ren, X., Huang, Z., Zhu, L. L., HE, G. C. 2004. Two whitebacked plant hopper resistance genes in rice share the same loci with those for brown planthopper resistance. *Heredity* 92:212–217.

Thaler, J.S., Karban, R., Ullman, D.E., Boege, K., Bostock, R.M. 2002. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: Effects on several plant parasites. *Oecologia* 131:227-235.

Thimm, O., Blaesing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L., Rhee, S., Stitt, M. 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto

diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37: 914–939.

Thompson, J.N. 2001. Coevolution. In: *Encyclopedia of life sciences*. London: Nature Publishing Group. pp. 1–5.

Thompson, J. 1999. What we know and do not know about coevolution: insect herbivores and plants as a test case. In H. Olff, V. K. Brown, R. H. Drent. *Herbivores: between plants and predators; the 38th symposium of the British Ecological Society in cooperation with the Netherlands Ecological Society held at the Wageningen Agricultural University, The Netherlands, 1997*. Oxford: Blackwell Science. pp. 7–30.

Thompson, J.N. 1998. The evolution of diet breadth: Monophagy and polyphagy in swallowtail butterflies. *Journal of Evolutionary Biology* 11:563–578.

Tjallingii, W.F. 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* 57 (4): 739–745.

Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D. 2007. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant Journal* 49:16–26.

Tooker, J.F., De Moraes, C.M. 2011. Feeding by a gall-inducing caterpillar species alters levels of indole-3-acetic and abscisic acid in *Solidago altissima* (Asteraceae) stems. *Arthropod Plant Interactions* 5: 115–124.

Turlings, T.C., Ton, J. 2006. Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Current Opinion Plant Biology* 9: 421–427.

Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., Lewis, WJ. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by hostseeking parasitic wasps. *Science* 250:1251–1253.

Unsicker, S.B., Kunert, G., Gershenzon, J. 2009. Protective perfumes: The role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion Plant Biology* 12(4): 479–485.

Van Den Boom, C. E. M., Van Beek, T. A., Posthumus, M. A., Groot, A., Dicke, M. 2004. Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *Journal Chemical Ecology* 30:69–89.

Vanderschuren, H., Lentz, E., Zainuddin, I, Gruissem, W. 2013. Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *Journal of proteomics*. JPROT-01453; No of Pages 15.

Vanderschuren, H., Nyaboga, E., Poon, J., Baerenfaller, K., Grossmann, J., Hirsch-Hoffmann, M., Kirchgessner, N., Nanni, P., Gruissem, W. 2014. Large-scale proteomics of the cassava storage root and identification of a target gene to reduce postharvest deterioration. The Plant Cellular IDs: 0000-0003-2102-9737 (H.V.); 0000-0002-1904-9440.

Van der Meijden, E., Wijn, M., Verkaar, H.J. 1988. Defence and regrowth, alternative plant strategies in the struggle against herbivores. *Oikos* 51: 355–363.

Van Poecke, R.M., Dicke, M. 2002. Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *Journal Experimental Botany* 53:1793–99.

Vargas, H., Bolivar, L., Arias, B., Bellotti, A.C. 2002. Nataima-31 variedad de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) resistente a mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis* Bondar) para el valle cálido del Alto Magdalena. Colombian Ministry of Agriculture and New.

Vásquez-Ordoñez, A., Parsa, S. 2014. A geographic distribution database of *Mononychellus* mites (Acari, Tetranychidae) on cassava (*Manihot esculenta*). Zookeys. 407: 1-8.

Vert, G. 2008. Plant signaling: brassinosteroids, immunity and effectors Are BAK!. Current Biology 18: 963–965.

Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 95:7209–14.

Voelckel, C., Weisser, W.W., Baldwin, I.T. 2004. An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. Molecular Ecology 13:3187–95.

Vuorinen, T., Nerg, A.M., Holopainen, J.K. 2004. Ozone exposure triggers the emission of herbivore-induced plant volatiles, but does not disturb tritrophic signalling. Environment Pollution 131 (2): 305-311.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Hendrickson Culler, A., Dong, X. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. Current Biology 17: 1784–1790.

Walling, L.L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. Journal Plant Growth Regulation 19:195–216.

Walters, D.R., McRoberts, N. 2006. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins?. Trends Plant Science 11: 581–586.

Washburn, M. P.; Wolters, D.; Yates, J. R. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Natural Biotechnology 19 (3): 242–247.

Wasternack, C., Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. Trends in Plant Science 2: 302–307.

Webster, J., Treat, R., Morgan, L., Elliott, N. 2000. Economic impact of the Russian wheat aphid and greenbug in the western United States 1993–1994, 1994–1995, and 1997–1998. USDAARS Service Report PSWCRL Rep. 00–001.

Welch, B.L. 1947. The generalization of ‘students’ problem when several different population variances are involved. Biometrika 34: 28-35.

Whittaker, R.H., Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. Science 171: 757–770.

Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 64: 3–19.

Wu, CH., Yeh, R.S., Suzek, B.E., Vinayaka, C.R., Zhang, J., Barker, W.N. 2003. The Protein Information Resource. Nucleic Acids Research 31(1): 345-347.

Xu, Y., Zhu, Q., Panbangred, W., Shirasu, K., Lamb, C. 1996. Regulation, expression and function of a new basic chitinase gene in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Molecular Biology 30: 387–401.

Yaninek, J.S., Gutierrez, A.P., Herren, H.R. 1984. The influence of temperature and host plant quality on the biotic potential of the cassava green mite, *Mononychellus progresivus* Doreste. International Institute of tropical Agriculture (IITA) (Ibadan, NG). 37p.

Yang, D.H. Hettenhausen, C., Baldwin, I., Wu, J. 2011. BAK1 regulates the accumulation of jasmonic acid and the levels of trypsin proteinase inhibitors in *Nicotiana attenuata*’s responses to herbivory. Journal of Experimental Botany 62: 641–652.

Yassen, M., Bennet, F.D. 1977. Distribution, biology and population dynamics of the green cassava mite in the neotropics. Pp. 197-902. In Proceedings of the Forth Simposium of the International Society for Tropical Root Crops. Ed. J. Cock, R. Mac Intyre and M. Graham. International Development Research Centre. Ottawa.

Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R. 2005. Increase in toxicity of an invasive weed after reassociation with its coevolved herbivore. Proceedings National Academy of Science of USA 102: 15529–15532.

Zarate, S.I., Kempema, L.A., Walling, L.L. 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. Plant Physiology 143: 866-875.

Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S., Stacey, G. 2002. Characterization of early, chitin induced gene expression in *Arabidopsis*. Molecular Plant Microbe Interactions 15: 963-970.

Zhang, L., Xing, D. 2008. Methyl jasmonate induces production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. Plant Cell Physiology 49(7): 1092-1111.

Zhu-Salzman, K., Salzman, R.A., Ahn, J.E., Koiwa, H. 2004. Transcriptional regulation of *Sorghum* defense determinants against a phloem-feeding aphid. Plant Physiology 134: 420–431.

Zhu-Salzman, K., Luthe, D.S., Felton, G.W. 2008. Arthropod-inducible proteins: Broad spectrum defenses against multiple herbivores. Plant Physiology 146: 852–858.



**Tabla suplementaria 1.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en defensa para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
stress.biotic.PR-proteins	at4g23690	disease resistance-responsive family protein / dirigent	0.212535	-0.11357	1.187859	0.05781
stress.biotic.PR-proteins	at4g27190	disease resistance protein (NBS-LRR class), putative	0.378926	-0.33218	-3.03453	0.596001
stress.biotic.PR-proteins	at5g23400	disease resistance family protein / LRR family protein	-0.25952	-0.97822	0.267647	-1.05559
stress.biotic.PR-proteins	at3g14470	disease resistance protein (NBS-LRR class), putative	0.04781	-0.86577	0.879654	-0.43723

**Tabla suplementaria 2.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en defensa para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
stress.biotic.PR-proteins	at5g24090	acidic endochitinase (CHIB1)   chr5:8143699-8	1.814698	1.873116	0.818487	2.840717
stress.biotic.PR-proteins	at4g27220	disease resistance protein (NBS-LRR class),	1.668656	1.953181	0.688854	1.323568
stress.biotic.PR-proteins	at3g14470	disease resistance protein (NBS-LRR class),	-1.11873	-1.19023	-0.27657	-1.09098

**Tabla suplementaria 3.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en metabolismo de hormonas para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
hormone metabolism.abscisic acid.synthesis-degradati	at4g19170	Symbols: NCED4   NCED4 (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOX	-0.84017	-3.03074	-4.94038	-0.84036
hormone metabolism.abscisic acid.synthesis-degradati	at2g27150	Symbols: AAO3   AAO3 (Abscisic ALDEHYDE OXIDASE 3); absc	-0.31394	-1.10733	-1.07257	-0.72908
hormone metabolism.auxin.signal transduction	at3g02260	Symbols: BIG, DOC1, TIR3, UMB1, ASA1, LPR1, CRM1   BIG (BI	-0.29801	-0.99807	-0.92929	-0.39481
hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsiv	at2g34680	Symbols: AIR9   AIR9; protein binding   chr2:14616622-14629129 F	-0.27804	-0.62025	-0.28357	-0.23202
hormone metabolism.brassinosteroid.synthesis-degradat	at1g50430	Symbols: DWF5, PA, LE, ST7R, 7RED   DWF5 (DWARF 5); sterc	-0.20112	-0.45807	-0.09415	-0.19998
hormone metabolism.brassinosteroid.synthesis-degradat	at3g19820	Symbols: DWF1, DIM, EVE1, DIM1, CBB1   DWF1 (DWARF 1); c	-0.198	-0.35272	0.022266	-0.16706
hormone metabolism.brassinosteroid.signal transductio	at4g30610	Symbols: BRS1, SCPL24   BRS1 (BRI1 SUPPRESSOR 1); serine	-0.14206	-0.28599	0.205205	0.169283
hormone metabolism.cytokinin.synthesis-degradation	at1g22400	Symbols: UGT85A1, ATUGT85A1   UGT85A1; UDP-glycosyltransf	0.028063	-0.26548	0.406915	0.471763
hormone metabolism.ethylene.induced-regulated-respor	at1g55150	DEAD box RNA helicase, putative (RH20)   chr1:20574480-205773	0.678988	0.920531	1.62432	0.844677
hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation	at3g45140	Symbols: LOX2, ATLOX2   LOX2 (LIPOXYGENASE 2); lipoxigena	0.722246	1.45062	1.735972	1.003678

**Tabla suplementaria 4.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicados en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso_Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
hormone metabolism. abscisic acid induced-regulated-responsive-activated	at1g28200	Symbols: FIP1   FIP1 (FH INTERACTING PROTEIN 1)   chr1:9850147-9852366 REVERSE	-0.64121	-5.51704	-2.62956	-1.53041
hormone metabolism. auxin. synthesis-degradation	at1g51760	Symbols: IAR3, JR3   IAR3 (IAA-ALANINE RESISTANT 3); IAA-Ala conjugate hydrolase/ metal	-0.41657	-1.18793	-0.75444	-1.08462
hormone metabolism. auxin. signal transduction	at1g70940	Symbols: PIN3, ATPIN3   PIN3 (PIN-FORMED 3); auxin:hydrogen symporter/ transporter   chr1	-0.19938	-0.78898	-0.72742	-0.49793
hormone metabolism. auxin. signal transduction	at1g05180	Symbols: AXR1   AXR1 (AUXIN RESISTANT 1); small protein activating enzyme   chr1:1498114	0.003047	-0.20661	-0.28007	-0.06748
hormone metabolism. auxin. signal transduction	at3g02260	Symbols: BIG, DOC1, TIR3, UMB1, ASA1, LPR1, CRM1   BIG (BIG); binding / ubiquitin-protein	0.020978	-0.1791	-0.17517	-0.03878
hormone metabolism. auxin. signal transduction	at2g02560	Symbols: CAND1, ATCAND1, ETA2, TIP120, HVE   CAND1 (CULLIN-ASSOCIATED AND NEC	0.144371	-0.0625	-0.16523	0.080765
hormone metabolism. auxin. induced-regulated-responsive-activated	at1g60710	Symbols: ATB2   ATB2; oxidoreductase   chr1:22354753-22356761 REVERSE	0.259183	-0.06173	-0.01295	0.109661
hormone metabolism. auxin. induced-regulated-responsive-activated	at5g35735	auxin-responsive family protein   chr5:13900752-13902997 REVERSE	0.322206	0.048067	0.02723	0.132785
hormone metabolism. auxin. induced-regulated-responsive-activated	at3g07390	Symbols: AIR12   AIR12; extracellular matrix structural constituent   chr3:2365301-2366496 FC	0.335364	0.048738	0.073422	0.175878
hormone metabolism. auxin. induced-regulated-responsive-activated	at3g26370	unknown protein   chr3:9656744-9659935 FORWARD	0.423083	0.307132	0.186845	0.444562
hormone metabolism. brassinosteroid. synthesis-degradation. BRs. DET	at5g16010	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein / steroid 5-alpha-reductase family protein	0.462131	0.329198	0.222659	0.661804
hormone metabolism. brassinosteroid. synthesis-degradation. sterols. S	at1g20330	Symbols: SMT2, CYP1, FRL1   SMT2 (STEROL METHYLTRANSFERASE 2); S-adenosyl(meth	0.496835	0.39276	0.233643	0.721768
hormone metabolism. brassinosteroid. synthesis-degradation. sterols. S	at5g13710	Symbols: SMT1, CYP1   SMT1 (STEROL METHYLTRANSFERASE 1); sterol 24-C-methyltransf	0.532519	0.513987	0.495008	0.835226
hormone metabolism. brassinosteroid. synthesis-degradation. sterols. F	at3g52940	Symbols: FK, HYD2, ELL1   FK (FACKEL); delta14-sterol reductase   chr3:19630198-19633291	0.573111	0.647517	0.496544	1.006451
hormone metabolism. brassinosteroid. synthesis-degradation. sterols. H	at1g20050	Symbols: HYD1   HYD1 (HYDRA1); C-8 sterol isomerase   chr1:6949043-6950319 FORWARD	0.846085	0.734801	0.59381	1.014023
hormone metabolism. ethylene. synthesis-degradation	at5g43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative   chr5:17457125-17458797 REVERSE	0.863159	0.893607	0.606836	1.14447
hormone metabolism. ethylene. synthesis-degradation	at2g30830	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative   chr2:13132707-13134284 REVERSE	0.886984	1.06529	0.808593	1.18624
hormone metabolism. ethylene. synthesis-degradation. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate	at1g05010	Symbols: EFE, ACO4, EAT1   EFE (ETHYLENE-FORMING ENZYME); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate	1.001179	1.10097	1.083976	1.186844
hormone metabolism. ethylene. induced-regulated-responsive-activated	at1g55150	DEAD box RNA helicase, putative (RH20)   chr1:20574480-20577320 FORWARD	1.391367	1.28162	1.260104	1.348629
hormone metabolism. jasmonate. synthesis-degradation. lipoxygenase	at3g45140	Symbols: LOX2, ATLOX2   LOX2 (LIPOXYGENASE 2); lipoxygenase   chr3:16525410-16529351	1.40993	1.330034	1.497468	1.593322
hormone metabolism. jasmonate. synthesis-degradation. allene oxidase	at5g42650	Symbols: AOS, CYP74A, DDE2   AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE); allene oxide synthase/	1.63559	1.836278	1.997972	2.125614
hormone metabolism. jasmonate. synthesis-degradation. 12-Oxo-PDA-r	at1g76690	Symbols: OPR2, ATOPR2   OPR2   chr1:28778890-28780483 FORWARD	1.789059	1.894752	2.128503	3.314917
hormone metabolism. salicylic acid. synthesis-degradation	at3g11480	Symbols: BSMT1, ATBSMT1   BSMT1; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase   c	4.968693	3.953573	2.994023	5.155439

**Tabla suplementaria 5.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en estrés oxidativo para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
redox.thioredoxin	at5g04260	Symbols: WCRKC2   WCRKC2 (WCRKC THIOREDOXIN 2); chr5:1178644-1178644	-0.56542	-1.19573	0.294209	-0.96903
redox.thioredoxin	at1g43560	Symbols: Aty2   Aty2 (Arabidopsis thioredoxin y2); electron carrier/ protein c	-0.37959	-0.86125	0.443404	-0.78176
redox.thioredoxin	at1g04980	Symbols: ATPDIL2-2, ATPDI10, PDI10   ATPDIL2-2 (PDI-LIKE 2-2); protein c	-0.47155	-0.59294	0.118301	-0.32148
redox.thioredoxin	at4g04950	thioredoxin family protein   chr4:2517666-2519977 REVERSE	-0.24104	-0.42956	0.200609	-0.51536
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at3g27820	Symbols: ATMDAR4, MDAR4   MDAR4 (MONODEHYDROASCORBATE RE	-0.0346	-0.25606	0.364926	-0.18313
redox.ascorbate and glutathione	at2g25080	Symbols: ATGPX1   ATGPX1 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 1); glutathione	-0.06205	-0.23107	-1.88892	-0.91618
redox.thioredoxin	at3g51030	Symbols: ATTRX1, ATTRX H1   ATTRX1; oxidoreductase, acting on sulfur gr	-0.32659	-0.17099	0.574524	-0.31938
redox.ascorbate and glutathione.glutathione	at4g11600	Symbols: ATGPX6, PHGPX, LSC803   ATGPX6 (GLUTATHIONE PEROXIDA	0.169021	-0.07296	0.628573	0.137962
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at1g77490	Symbols: TAPX   TAPX (THYLAKOIDAL ASCORBATE PEROXIDASE); L-as	0.123121	-0.04886	1.114613	-0.16833
redox.thioredoxin	at5g16400	Symbols: TRXF2, ATF2   ATF2; enzyme activator   chr5:5363661-5365334 R	-0.14973	0.016185	0.812419	-0.27162
redox.thioredoxin	at3g17880	Symbols: HIP, ATTDX, ATHIP2   ATTDX (TETRATICOPEPTIDE DOMAIN-CO	-0.09524	0.110757	0.367318	0.089198
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at1g75270	Symbols: DHAR2   DHAR2 (DEHYDROASCORBATE REDUCTASE 2); gluta	0.019522	0.138886	0.766937	-0.0438
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate.GME	at5g28840	Symbols: GME   GME (GDP-D-MANNOSE 3',5'-EPIMERASE); GDP-manno	0.151081	0.38637	-0.59584	0.234261
redox.glutaredoxins	at5g40370	glutaredoxin, putative   chr5:16147594-16149198 REVERSE	0.316303	0.884693	0.46112	1.08046
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at3g09940	Symbols: MDHAR, ATMDAR3   MDHAR (MONODEHYDROASCORBATE R	0.132345	0.983134	1.000453	1.069654
redox.peroxiredoxin	at3g26060	Symbols: ATPRX Q   ATPRX Q; antioxidant/ peroxiredoxin   chr3:9524733-9	0.769683	1.084495	0.642742	0.904417
redox.dismutases and catalases	at1g12520	Symbols: ATCCS   ATCCS (COPPER CHAPERONE FOR SOD1); superoxid	0.855367	1.932363	0.088629	0.848374
redox.dismutases and catalases	at4g35090	Symbols: CAT2   CAT2 (CATALASE 2); catalase   chr4:16700596-16703325	1.454673	2.46713	3.374654	1.538824

**Tabla suplementaria 6.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en estrés oxidativo para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
redox.thioredoxin	at3g25580	thioredoxin-related   chr3:9292485-9294347 FORWARD	-0.99185	-1.19436	-1.18425	-2.07664
redox.ascorbate and glutathione.glutathione	at5g27380	Symbols: GSH2, GSHB   GSH2 (GLUTATHIONE SYNTHETASE 2);	-0.48587	-0.49201	-1.17625	-1.30494
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate.GME	at5g28840	Symbols: GME   GME (GDP-D-MANNOSE 3',5'-EPIMERASE); GDF	-0.40549	-0.44704	-0.97584	-0.74015
redox.dismutases and catalases	at1g08830	Symbols: CSD1   CSD1 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASI	-0.32012	-0.4121	-0.33496	-0.71708
redox.dismutases and catalases	at4g35090	Symbols: CAT2   CAT2 (CATALASE 2); catalase   chr4:16700596-16	-0.29263	-0.3755	-0.32395	-0.58661
redox.thioredoxin	at1g04980	Symbols: ATPDIL2-2, ATPDI10, PDI10   ATPDIL2-2 (PDI-LIKE 2-2);	-0.28812	-0.36314	-0.22158	-0.46269
redox.ascorbate and glutathione	at3g48890	Symbols: ATPM2, ATMAPR3, MSBP2, MAPR3   ATPM2; heme bin	-0.27933	-0.3551	-0.16726	-0.35943
redox.thioredoxin	at1g21750	Symbols: ATPDIL1-1, ATPDI5, PDI5   ATPDIL1-1 (PDI-LIKE 1-1); prc	-0.16113	-0.17234	-0.1417	-0.22738
redox.thioredoxin	at2g47470	Symbols: ATPDIL2-1, UNE5, MEE30, PDI11, ATPDI11   UNE5 (UNF	-0.15253	-0.13013	-0.05222	-0.15971
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at3g27820	Symbols: ATMDAR4, MDAR4   MDAR4 (MONODEHYDROASCOR	-0.01611	-0.00815	0.013756	-0.13591
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at4g35000	Symbols: APX3   APX3 (ASCORBATE PEROXIDASE 3); L-ascorbat	0.089983	0.013395	0.015599	-0.1009
redox.thioredoxin	at5g60640	Symbols: ATPDIL1-4, PDI2, ATPDI2   ATPDIL1-4 (PDI-LIKE 1-4); prc	0.154298	0.085767	0.078169	0.034389
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate.L-galact	at4g33670	L-galactose dehydrogenase (L-GalDH)   chr4:16169523-16171561 Rf	0.184934	0.090559	0.083534	0.101374
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at4g08390	Symbols: SAPX   SAPX (STROMAL ASCORBATE PEROXIDASE);	0.259409	0.108301	0.116261	0.531886
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at4g09010	Symbols: APX4   APX4 (ASCORBATE PEROXIDASE 4); heme bind	0.374997	0.127701	0.184669	0.588487
redox.dismutases and catalases	at5g51100	Symbols: FSD2   FSD2 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 2); superox	0.392461	0.27697	0.256668	0.639517
redox.ascorbate and glutathione.glutathione	at3g24170	Symbols: ATGR1   ATGR1 (glutathione-disulfide reductase); FAD bin	0.406132	0.355525	0.279865	0.668496
redox.ascorbate and glutathione.glutathione	at3g54660	Symbols: GR, EMB2360, ATGR2   GR (GLUTATHIONE REDUCTAS	0.424099	0.452364	0.469411	0.700461
redox.ascorbate and glutathione	at3g19010	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein   chr3:6556197	0.424318	0.544234	0.662486	0.792399
redox.ascorbate and glutathione.ascorbate.L-Galact	at3g47930	Symbols: ATGLDH   ATGLDH (L-GALACTONO-1,4-LACTONE DEH	0.503061	0.721714	0.748426	0.878946
redox.thioredoxin	at2g41680	Symbols: NTRC   NTRC (NADPH-DEPENDENT THIOREDOXIN RED	0.570167	0.899789	0.783111	0.992696
redox.ascorbate and glutathione	at3g19000	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein   chr3:6553529	1.277356	1.305496	0.822172	3.524009

**Tabla suplementaria 7.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en factores de transcripción para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	at1g68710	haloacid dehalogenase-like hydrolase family	0.498265	0.347405	-0.28008	0.522999
RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	at1g05270	TraB family protein   chr1:1531641-1534410 F	-0.27562	-0.31149	-0.66306	-0.74632
RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	at3g12250	Symbols: TGA6, BZIP45   TGA6 (TGACG MC	-0.53927	-0.94591	0.175164	0.075231
RNA.regulation of transcription.MYB-related transcription facto	at1g09770	Symbols: ATCDC5, CDC5, ATMYBCDC5   A	0.349707	0.346757	0.20237	-0.11628
RNA.regulation of transcription.MYB-related transcription facto	at1g49010	myb family transcription factor   chr1:1813264	-0.29678	-0.08927	-0.39602	-0.91616

**Tabla suplementaria 8.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en MAPKinasas para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
signalling.MAP kinases	at4g08500	Symbols: MEKK1,	-0.25177	-0.36078	-0.6809	0.060283

**Tabla suplementaria 9.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en MAPKinasas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
signalling.MAP kinases	at3g21220	Symbols: ATMKK5, ATM	0.240356	0.26126	-0.20639	-0.31583
signalling.MAP kinases	at1g07880	Symbols: ATPK13   AT	0.03327	0.572344	0	-1.40546
signalling.MAP kinases	at4g29810	Symbols: ATMKK2, MKK	0.292788	0.329085	-0.3546	-0.35431



**Tabla suplementaria 10.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en señalización para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
signalling.in sugar and nutrient physiology	at4g01900	Symbols: PII, GLB1   GLB1 (GLNB	-0.72496	-1.06937	-3.31808	-0.97916
signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII-1	at1g06840	leucine-rich repeat transmembrane	-0.50979	-0.83228	-1.78324	-0.64105
signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII-2	at1g53440	leucine-rich repeat family protein / p	-0.45187	-0.62447	-1.45676	-0.45794
signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII-2	at3g14840	leucine-rich repeat family protein / p	-0.25177	-0.60444	-1.34074	-0.36732
signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII-2	at1g56130	leucine-rich repeat family protein / p	-0.24835	-0.57167	-1.12363	-0.31232
signalling.receptor kinases.proline extensin like	at1g52290	protein kinase family protein   chr1:	-0.24621	-0.45591	-1.12151	-0.29539
signalling.receptor kinases.proline extensin like	at3g24540	protein kinase family protein   chr3:	-0.22739	-0.4442	-0.76913	-0.24639
signalling.receptor kinases.proline extensin like	at4g32710	ATP binding / kinase/ protein kinas	-0.19067	-0.41689	-0.70935	-0.22963
signalling.receptor kinases.S-locus glycoprotein like	at4g21380	Symbols: ARK3   ARK3 (A. THALIA	-0.13459	-0.40092	-0.6809	-0.22095
signalling.receptor kinases.S-locus glycoprotein like	at1g11300	ATP binding / carbohydrate binding	-0.11512	-0.39478	-0.58534	-0.17831
signalling.receptor kinases.misc	at3g19320	leucine-rich repeat family protein   c	-0.00965	-0.36078	-0.56228	-0.15889
signalling.calcium	at5g56360	calmodulin-binding protein   chr5:22	-0.00293	-0.24462	-0.46788	-0.06351
signalling.calcium	at2g27030	Symbols: CAM5   CAM5 (CALMOD	0.057427	0.090189	-0.2192	0.019793
signalling.calcium	at5g04170	calcium-binding EF hand family pro	0.083456	0.271673	-0.21199	0.060283
signalling.calcium	at1g09210	calreticulin 2 (CRT2)   chr1:2972842	0.090759	0.315345	-0.14906	0.091432
signalling.calcium	at3g21180	Symbols: ACA9, ATACA9   ACA9 (	0.135764	0.539415	0.186949	0.110603
signalling.calcium	at1g29020	calcium-binding EF hand family pro	0.172323	0.70219	0.198864	0.351202
signalling.phosphinositides	at1g49340	Symbols: ATP14K ALPHA   ATP14K	0.173756	0.717409	0.300566	0.468715
signalling.G-proteins	at5g59840	Ras-related GTP-binding family prot	0.208302	0.807636	0.421133	0.489266
signalling.G-proteins	at1g48630	Symbols: RACK1B_AT   RACK1B_	0.490823	0.818848	0.450943	0.535142
signalling.G-proteins	at5g60860	Symbols: AtRABA1f   AtRABA1f (A	0.593402	0.900887	0.56842	0.559439
signalling.G-proteins	at5g42080	Symbols: ADL1, ADL1A, AG68, DF	0.773658	1.124126	0.706941	0.580024
signalling.MAP kinases	at4g08500	Symbols: MEKK1, ATMEKK1, MAI	0.787897	1.207904	1.062319	0.631932
signalling.light	at3g18890	binding / catalytic/ coenzyme bindi	0.804455	1.318005	1.173248	1.144772
signalling.light	at1g67310	calmodulin binding / transcription re	0.841843	1.432186	2.167716	2.297153

**Tabla suplementaria 11.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en señalización para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
signalling.in sugar and nutrient physiology	at5g64260	Symbols: EXL2   EXL2 (EXORDIUM LIKE 2)   ch	-0.99154	-0.98996	-2.36013	-1.40546
signalling.in sugar and nutrient physiology	at3g06483	Symbols: PDK, ATPDHK   PDK (PYRUVATE DE	-0.94713	-0.98379	-1.79149	-1.33735
signalling.receptor kinases.leucine rich rep	at1g48480	Symbols: RKL1   RKL1; ATP binding / kinase/ p	-0.73971	-0.84081	-1.4234	-1.14629
signalling.receptor kinases.leucine rich rep	at4g03390	Symbols: SRF3   SRF3 (STRUBBELIG-RECEP	-0.53042	-0.55046	-0.98896	-0.9798
signalling.receptor kinases.leucine rich rep	at3g14840	leucine-rich repeat family protein / protein kinase	-0.52406	-0.52971	-0.79836	-0.96918
signalling.receptor kinases.leucine rich rep	at5g65700	Symbols: BAM1   BAM1 (BARELY ANY MERIS	-0.43971	-0.40358	-0.74384	-0.95516
signalling.receptor kinases.Catharanthus rc	at3g51550	Symbols: FER   FER (FERONIA); kinase/ protei	-0.35623	-0.35469	-0.65897	-0.86228
signalling.calcium	at5g56360	calmodulin-binding protein   chr5:22823302-2282	-0.31893	-0.2802	-0.65376	-0.85743
signalling.calcium	at2g27030	Symbols: CAM5   CAM5 (CALMODULIN 5); calc	-0.31632	-0.26588	-0.58391	-0.65581
signalling.calcium	at5g04170	calcium-binding EF hand family protein   chr5:11	-0.30831	-0.20611	-0.55607	-0.64297
signalling.calcium	at1g35670	Symbols: ATCDPK2, CPK11, ATCPK11   ATCD	-0.23221	-0.13984	-0.48883	-0.64001
signalling.calcium	at3g57330	Symbols: ACA11   ACA11 (autoinhibited Ca2+-A	-0.19329	-0.1373	-0.43024	-0.63044
signalling.calcium	at1g19870	Symbols: iqd32   iqd32 (IQ-domain 32); calmodu	-0.15037	-0.12984	-0.3994	-0.54458
signalling.calcium	at2g17290	Symbols: CPK6, ATCDPK3   CPK6 (CALCIUM-I	-0.14014	-0.10789	-0.39417	-0.46732
signalling.calcium	at5g61900	Symbols: BON1, CPN1, BON   BON1 (BONZAI	-0.13107	-0.10157	-0.39341	-0.44698
signalling.calcium	at3g20290	Symbols: ATEHD1   ATEHD1 (EPS15 HOMOLC	-0.12118	-0.08647	-0.39126	-0.4454
signalling.calcium	at4g04720	Symbols: CPK21   CPK21; ATP binding / calciu	-0.0876	-0.07338	-0.3546	-0.3882
signalling.phosphoinositides	at5g59770	Symbols: SAC9   SAC9; inositol or phosphatidyl	-0.06094	-0.006707	-0.35093	-0.36745
signalling.phosphoinositides	at4g20260	Symbols: ATPCAP1, PCAP1   DREPP plasma r	-0.02012	0.022263	-0.33743	-0.35431
signalling.phosphoinositides	at1g49340	Symbols: ATP14K ALPHA   ATP14K ALPHA; 1-p	0.03327	0.138577	-0.23219	-0.32774
signalling.phosphoinositides.phosphoinositid	at3g08510	Symbols: ATPLC2   ATPLC2 (PHOSPHOLIPASI	0.033605	0.139231	-0.22229	-0.31894
signalling.G-proteins	at2g03150	Symbols: emb1579   emb1579 (embryo defective	0.041776	0.189336	-0.21797	-0.31583
signalling.G-proteins	at3g18610	Symbols: ATRANGAP1, PARLL1   ATRANGAP	0.065605	0.204041	-0.20639	-0.2641
signalling.G-proteins	at4g39520	GTP-binding protein, putative   chr4:18370968-18	0.092987	0.220406	-0.20633	-0.21473
signalling.G-proteins	at5g19320	Symbols: RANGAP2   RANGAP2 (RAN GTPAS	0.135582	0.226547	-0.13535	-0.15133
signalling.G-proteins	at1g48630	Symbols: RACK1B_AT   RACK1B_AT (RECEPT	0.229443	0.241029	-0.09288	-0.08614
signalling.G-proteins	at3g60860	guanine nucleotide exchange family protein   chr	0.23067	0.248762	-0.07892	-0.02996
signalling.G-proteins	at5g60860	Symbols: AtRABA1f   AtRABA1f (Arabidopsis R	0.240356	0.26126	-0.05692	-0.00657
signalling.G-proteins	at3g43300	Symbols: ATMIN7   ATMIN7 (ARABIDOPSIS TH	0.261772	0.262736	-0.0344	0.030266
signalling.G-proteins	at5g42080	Symbols: ADL1, ADL1A, AG68, DRP1A, RSW9	0.289111	0.27281	-0.03011	0.03039
signalling.G-proteins	at1g31930	Symbols: XLG3   XLG3 (extra-large GTP-binding	0.292788	0.329085	-0.01881	0.113295
signalling.G-proteins	at3g55020	RabGAP/TBC domain-containing protein   chr3:2	0.320341	0.336044	-0.00672	0.132047
signalling.G-proteins	at5g58590	Symbols: RANBP1   RANBP1 (RAN BINDING P	0.330084	0.345219	0	0.27237
signalling.G-proteins	at1g52280	Symbols: AtRABG3d   AtRABG3d (Arabidopsis	0.33319	0.374819	0.051201	0.321799
signalling.MAP kinases	at3g21220	Symbols: ATMKK5, ATMAP2K_ALPHA, MAP2K	0.368762	0.378465	0.069817	0.349898
signalling.MAP kinases	at1g07880	Symbols: ATMPK13   ATMPK13; MAP kinase/ I	0.435847	0.429715	0.14889	0.38507
signalling.MAP kinases	at4g29810	Symbols: ATMKK2, MKK2, MK1   ATMKK2 (AR	0.48858	0.433904	0.373558	0.466003
signalling.14-3-3 proteins	at1g34760	Symbols: GRF11, GF14 OMICRON   GRF11 (GF	0.52421	0.444757	0.388584	0.62795
signalling.14-3-3 proteins	at5g65430	Symbols: GRF8, 14-3-KAPPA, GF14 KAPPA	0.535828	0.540749	0.402606	0.679919
signalling.14-3-3 proteins	at1g78300	Symbols: GRF2, 14-3-OMEGA, GF14 OMEGA	0.540031	0.572344	0.450723	0.711651
signalling.light	at5g48800	phototropic-responsive NPH3 family protein   chr	0.542286	0.623505	0.542257	0.751832
signalling.light	at3g45780	Symbols: PHOT1, NPH1, JK224, RPT1   PHOT1	0.743641	0.653712	0.658556	0.786723
signalling.light	at1g09570	Symbols: PHYA, FHY2, FRE1, HY8   PHYA (PH	0.813771	0.67306	0.660079	0.806846
signalling.light	at2g18790	Symbols: PHYB, HY3, OOP1   PHYB (PHYTOC	0.857453	1.175365	0.939117	0.889922
signalling.light	at3g18890	binding / catalytic/ coenzyme binding   chr3:651	1.021521	1.207076	1.029049	1.352588
signalling.light	at4g18810	binding / catalytic/ transcription repressor   chr4:	1.408078	1.528821	1.139145	2.199334

**Tabla suplementaria 12.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en genes R para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
stress.biotic.receptors	at1g27170	ATP binding / protein binding	0.216074	0.420554	-0.36304	0.485836

**Tabla suplementaria 13.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en biosíntesis y modificación de pared celular para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico - Descripción	Accesión	6h	24h	4d	8d
cell wall.precursor synthesis	at1g31070	-1.19087	-2.48448	-1.6596	-1.74898
cell wall.precursor synthesis.NDP sugar pyrophosphorylase.GDP mannose	at2g39770	-0.81717	-1.86559	-1.528	-1.21938
cell wall.precursor synthesis.NDP sugar pyrophosphorylase.GDP fucose and fucokinase	at1g01220	-0.6941	-1.3091	-1.13134	-0.96722
cell wall.precursor synthesis.UGD	at5g15490	-0.68562	-1.06522	-0.59309	-0.68583
cell wall.precursor synthesis.UER	at1g63000	-0.43942	-1.02609	-0.57179	-0.65325
cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	at3g03050	-0.43893	-0.92683	-0.56613	-0.61412
cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	at5g05170	-0.3025	-0.86721	-0.50895	-0.47377
cell wall.cell wall proteins.AGPs	at2g04780	-0.23167	-0.70706	-0.29308	-0.46816
cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	at5g06860	-0.16893	-0.6901	-0.09103	-0.42216
cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	at3g55140	-0.11729	-0.57562	-0.08449	-0.36245
cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	at3g61490	-0.11658	-0.49697	0.117355	-0.13413
cell wall.modification	at2g39700	-0.11582	-0.47195	0.213259	-0.04475
cell wall.modification	at5g65730	-0.02194	-0.457	0.395416	0.012706
cell wall.pectin*esterases.misc	at4g02320	0.010555	-0.13577	0.618038	0.037846
cell wall.pectin*esterases.misc	at5g53370	0.149794	1.170269	0.665791	1.005844

**Tabla suplementaria 14.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en biosíntesis y modificación de pared celular para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico - Descripción	Accesión	6h	24h	4d	8d
cell wall.precursor synthesis.UXS	at3g62830	-0.76017	-0.49933	-0.83344	-1.27033
cell wall.degradation.cellulases and beta -1,4-glucanases	at3g47000	-0.51954	-0.49583	-0.23111	-0.17697
cell wall.cell wall proteins.RGP	at3g08900	-0.45983	-0.40165	0.524006	-0.83836
cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	at3g03050	-0.31488	0.401478	-0.69874	-1.68616
cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	at4g13710	-0.28894	-0.1859	0.22149	-0.51455
cell wall.precursor synthesis.UXS	at2g28760	-0.28881	-0.26575	-0.53269	-0.38278
cell wall.modification	at3g45970	-0.2624	-0.34892	0.05987	0.231712
cell wall.pectin*esterases.acetyl esterase	at3g62060	-0.14225	0.071514	0.397446	-0.3594
cell wall.precursor synthesis.UGE	at1g12780	-0.05611	-0.02438	0.333428	0.469462
cell wall.pectin*esterases.acetyl esterase	at5g26670	-0.02863	-0.10091	0.627963	0.702926
cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	at1g58370	-0.00823	0.242399	0.924596	0.594299
cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	at5g49360	0.050208	-0.15613	0.209042	1.40568
cell wall.precursor synthesis.UXS	at3g46440	0.07301	-0.0487	-0.63454	-0.70768
cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	at1g78060	0.147388	0.510206	-0.57061	0.236334
cell wall.degradation.cellulases and beta -1,4-glucanases	at5g20950	0.158148	0.282763	-0.37859	-0.056
cell wall.cell wall proteins.AGPs	at4g12730	0.160757	0.288408	0.784236	0.937785
cell wall.cell wall proteins.RGP	at5g16510	0.175134	-0.4116	-0.89379	-0.42037
cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	at3g55140	0.17921	0.355153	-0.07244	0.565402
cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	at3g10740	0.188116	0.277159	0.263945	0.71509
cell wall.pectin*esterases.PME	at3g14310	0.28961	0.497883	0.206374	0.598014
cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	at4g32410	0.326761	-0.00228	-0.94848	-0.08221
cell wall.modification	at5g65730	0.477663	-0.27539	1.441605	2.613938
cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	at5g64740	0.480818	0.778206	-0.06371	-1.23051
cell wall.precursor synthesis.UER	at1g63000	0.511704	0.684134	-0.56834	0.153945
cell wall.pectin*esterases.PME	at3g49220	0.572018	0.73033	-1.39376	0.59075
cell wall.precursor synthesis.KDO pathway.CMP-KDO Synthetase	at1g53000	0.611485	0.580075	0.491922	1.05302
cell wall.pectin*esterases.PME	at5g20860	0.651159	0.19658	1.145057	1.937188
cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	at5g01930	0.663124	0.86182	0.187503	1.108453
cell wall.precursor synthesis.AXS	at1g08200	0.753967	1.160828	1.132887	-0.05133
cell wall.cell wall proteins.AGPs	at5g55730	0.919501	0.900244	-0.23178	0.03849
cell wall.cell wall proteins.RGP	at3g02230	0.968293	0.749562	1.617047	2.051465
cell wall.precursor synthesis.GMD	at3g51160	1.172926	1.059609	0.742071	1.222206
cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	at1g67750	1.236848	2.074809	2.168499	0.813504
cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	at1g55850	1.251155	1.353777	1.412279	1.217152
cell wall.cellulose synthesis	at5g22740	1.787567	1.566278	-2.28109	-0.14973
cell wall.hemicellulose synthesis.xyloglucan.XXXG galactose Transferase	at2g20370	2.233939	2.027183	0.328227	0.434052



**Tabla suplementaria 15.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en el metabolismo secundario para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.DXS	at4g15560	Symbols: CLA1, DEF, CLA, DXS, DXPS2   CLA1 (CLOROPL	-2.49209	-3.23683	-2.28778	-4.55547
secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.HDS	at5g60600	Symbols: GCPE, ISPG, CSB3, CLB4, HDS   HDS (4-HYDRC	-0.95433	-2.16597	-1.95912	-2.07431
secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.acetyl-C	at5g48230	Symbols: EMB1276, ACAT2   ACAT2 (ACETOACETYL-COA	-0.71748	-1.47248	-1.88548	-1.43014
secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.HMG-Co	at4g11820	Symbols: MVA1   MVA1; acetyl-CoA C-acetyltransferase/ hy	-0.71566	-1.44667	-1.6634	-1.38224
secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.HMG-Co	at1g76490	Symbols: HMG1, HMGR1   HMG1 (HYDROXY METHYLGLU	-0.64431	-1.34848	-1.07796	-1.29677
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	at2g37040	Symbols: pal1, ATPAL1   pal1 (Phe ammonia lyase 1); pheny	-0.58782	-1.31655	-0.73497	-1.21857
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	at3g53260	Symbols: PAL2, ATPAL2   PAL2; phenylalanine ammonia-ly	-0.57228	-1.30847	-0.45392	-1.19185
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.C4H	at2g30490	Symbols: ATC4H, C4H, CYP73A5   C4H (CINNAMATE-4-HY	-0.54042	-1.1052	-0.42672	-0.91598
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.4CL	at1g51680	Symbols: 4CL1, 4CL.1, AT4CL1   4CL1 (4-COUMARATE:CO	-0.48767	-1.09529	-0.39266	-0.85743
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.HCT	at5g48930	Symbols: HCT   HCT (HYDROXYCINNAMOYL-COA SHIKIM	-0.44753	-0.93615	-0.09979	-0.82377
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CCo	at4g34050	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative   chr4:1631077	-0.43282	-0.88269	-0.04474	-0.74488
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.COM	at5g54160	Symbols: ATOMT1, OMT1   ATOMT1 (O-METHYLTRANSFEI	-0.34844	-0.79772	0.31196	-0.74385
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAC	at4g37990	Symbols: ELI3-2, ELI3, ATCAD8, CAD-B2   ELI3-2 (ELICITOF	-0.31371	-0.7819	0.32606	-0.68703
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAC	at4g37980	Symbols: ELI3-1, ELI3, ATCAD7, CAD7   ELI3-1 (ELICITOR-1	-0.26971	-0.73994	0.543933	-0.64208
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAC	at4g39330	Symbols: ATCAD9, CAD9   CAD9 (CINNAMYL ALCOHOL DE	-0.25085	-0.72993	0.545565	-0.62838
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAC	at3g19450	Symbols: CAD4, ATCAD4, CAD, CAD-C   ATCAD4; cinnamy	-0.2236	-0.71481	0.575972	-0.58438
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAC	at4g37970	Symbols: ATCAD6, CAD6   CAD6 (CINNAMYL ALCOHOL DE	-0.20276	-0.59561	0.656879	-0.57465
secondary metabolism.N misc. alkaloid-like	at3g57030	strictosidine synthase family protein   chr3:21101457-211032	-0.15382	-0.51856	0.675754	-0.55979
secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins.leucocyanidin ox	at4g22880	Symbols: LDOX, TDS4, TT18, ANS   LDOX (LEUCOANTHOC	-0.13275	-0.51485	0.711058	-0.45124
secondary metabolism.flavonoids.chalcones	at1g59960	aldo/keto reductase, putative   chr1:22071292-22073147 REV	-0.1201	-0.28607	0.835359	-0.34217
secondary metabolism.flavonoids.chalcones	at5g05270	chalcone-flavanone isomerase family protein   chr5:1563320-1	-0.04566	-0.07433	0.855185	-0.22672
secondary metabolism.flavonoids.chalcones.naringenin-chalcone	at5g13930	Symbols: CHS, TT4, ATCHS   TT4 (TRANSPARENT TESTA	-0.01325	0.039542	1.072684	-0.10711
secondary metabolism.flavonoids.chalcones.chalcone isomerase	at3g55120	Symbols: TT5, A11, CFI   TT5 (TRANSPARENT TESTA 5); cl	0.012689	0.05048	1.118782	0.317964
secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols	at5g54010	glycosyltransferase family protein   chr5:21919781-21921189	0.052298	0.054816	1.189977	0.363546
secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols.dihydrokaempferol	at1g61720	Symbols: BAN   BAN (BANYULS); oxidoreductase   chr1:227	0.166862	0.415298	1.267108	0.449653
secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols.flavanone 3-dio	at3g51240	Symbols: F3H, TT6, F3H   F3H (FLAVANONE 3-HYDROXYL	0.178649	0.443967	1.560033	0.510299
secondary metabolism.flavonoids.isoflavonols	at1g75290	oxidoreductase, acting on NADH or NADPH   chr1:28253890-	0.349586	0.525173	1.59383	0.589228
secondary metabolism.flavonoids.isoflavonols	at4g39230	isoflavone reductase, putative   chr4:18265885-18267829 REV	0.451266	0.666363	1.655081	0.714644
secondary metabolism.unspecified	at5g57590	Symbols: BIO1   BIO1 (biotin auxotroph 1); adenosylmethioni	1.018576	1.699876	1.70157	1.254789

**Tabla suplementaria 16.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en metabolismo secundario para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway	at1g74470	geranylgeranyl reductase   chr1:27991165-	-1.12589	-1.64791	-1.53797	-3.20218
secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.CMK	at2g26930	Symbols: ATCDPMEK, PDE277, ISPE   A	-0.67716	-0.69219	-1.18727	-2.64922
secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.HDR	at4g34350	Symbols: CLB6, ISPH, HDR   HDR (4-HYC	-0.55206	-0.65228	-0.99466	-2.00321
secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.geranyl	at4g36810	Symbols: GGPS1   GGPS1 (GERANYLGE	-0.49747	-0.58318	-0.88259	-1.74324
secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.HMG-CoA	at4g11820	Symbols: MVA1   MVA1; acetyl-CoA C-ac	-0.41996	-0.55965	-0.87452	-1.65912
secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.geranyl di	at1g17050	Symbols: SPS2   SPS2 (Solanesyl diphos	-0.39798	-0.54856	-0.58625	-1.42645
secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.farnesyl py	at4g17190	Symbols: FPS2   FPS2 (FARNESYL DIPH	-0.39236	-0.5043	-0.51996	-0.90282
secondary metabolism.isoprenoids.tocopherol biosynthesis.MPBQ	at3g63410	Symbols: APG1, VTE3, IEP37, E37   APG	-0.3286	-0.42329	-0.32704	-0.81856
secondary metabolism.isoprenoids.carotenoids	at1g57770	amine oxidase family   chr1:21395196-213	-0.31242	-0.36144	-0.29522	-0.71125
secondary metabolism.isoprenoids.carotenoids.phytoene synthase	at5g17230	phytoene synthase (PSY) / geranylgeranyl	-0.29297	-0.30025	-0.23759	-0.65346
secondary metabolism.isoprenoids.carotenoids.carotenoid cleavage	at3g63520	Symbols: CCD1, ATCCD1, ATNCED1, NCI	-0.16557	-0.23212	-0.11251	-0.63675
secondary metabolism.isoprenoids.terpenoids	at5g42600	Symbols: MRN1   MRN1 (MARNERAL SYI	-0.13569	-0.22781	-0.11188	-0.60821
secondary metabolism.phenylpropanoids	at4g05160	4-coumarate-CoA ligase, putative / 4-coun	-0.11856	-0.11511	-0.10584	-0.54106
secondary metabolism.phenylpropanoids	at4g35160	O-methyltransferase family 2 protein   chr4	-0.1082	-0.06294	-0.06321	-0.42769
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	at2g37040	Symbols: pal1, ATPAL1   pal1 (Phe ammo	-0.07006	-0.02592	-0.04629	-0.40953
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	at3g53260	Symbols: PAL2, ATPAL2   PAL2; phenylal	-0.0564	-0.02337	-0.04107	-0.39536
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	at3g10340	Symbols: PAL4   PAL4 (Phenylalanine am	-0.02349	-0.01082	-0.02596	-0.26206
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.HCT	at5g48930	Symbols: HCT   HCT (HYDROXYCINNAMC	-0.00597	0.003737	0.007061	-0.08445
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.COMT	at5g54160	Symbols: ATOMT1, OMT1   ATOMT1 (O-M	0.086396	0.03952	0.04049	0.045786
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	at4g37990	Symbols: ELI3-2, ELI3, ATCAD8, CAD-B2	0.098573	0.099853	0.043365	0.154009
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	at4g37980	Symbols: ELI3-1, ELI3, ATCAD7, CAD7   E	0.111707	0.127726	0.047235	0.165178
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	at4g39330	Symbols: ATCAD9, CAD9   CAD9 (CINNAI	0.131106	0.199328	0.10144	0.265858
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	at3g19450	Symbols: CAD4, ATCAD4, CAD, CAD-C	0.188057	0.254732	0.134278	0.299045
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	at4g37970	Symbols: ATCAD6, CAD6   CAD6 (CINNAI	0.271847	0.308235	0.169758	0.318433
secondary metabolism.N misc.alkaloid-like	at1g08470	strictosidine synthase family protein   chr1	0.290766	0.387409	0.24068	0.360184
secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.synthesis.a	at3g49680	Symbols: ATBCAT-3, BCAT3   BCAT3 (BR	0.326365	0.4033	0.341995	0.370053
secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.synthesis.a	at4g13430	Symbols: IIL1   IIL1 (ISOPROPYL MALATE	0.334345	0.442515	0.377152	0.407881
secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.synthesis.a	at1g80560	3-isopropylmalate dehydrogenase, chloropl	0.417133	0.448789	0.451143	0.443356
secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.synthesis.s	at4g31500	Symbols: CYP83B1, SUR2, RNT1, RED1,	0.434144	0.459116	0.634083	0.484324
secondary metabolism.wax	at1g68530	Symbols: CUT1, POP1, CER6, G2, KCS6	0.501396	0.769104	0.647827	0.599023
secondary metabolism.wax	at5g57800	Symbols: FLP1, YRE, CER3, WAX2   CEF	0.528308	0.844496	0.780735	0.640462
secondary metabolism.wax	at5g28280	pseudogene, sterol desaturase domain-cor	0.673351	0.928605	0.805075	0.691774
secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins	at2g22590	transferase, transferring glycosyl groups   c	0.673387	0.997407	0.836717	0.715803
secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins.leucocyanidin oxyg	at4g22880	Symbols: LDOX, TDS4, TT18, ANS   LDOX	0.733327	1.032821	0.839147	0.876023
secondary metabolism.flavonoids.chalcones	at1g53520	chalcone-flavanone isomerase-related   chr	0.761195	1.168898	0.917518	1.090758
secondary metabolism.flavonoids.chalcones	at1g59960	aldo/keto reductase, putative   chr1:220712	0.803127	1.215537	0.94798	1.649476
secondary metabolism.flavonoids.chalcones	at5g05270	chalcone-flavanone isomerase family protei	0.994556	1.258981	0.977938	1.683459
secondary metabolism.flavonoids.chalcones.naringenin-chalcone s	at5g13930	Symbols: CHS, TT4, ATCHS   TT4 (TRANS	1.848139	1.556783	1.02516	1.816391
secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols	at5g54010	glycosyltransferase family protein   chr5:21	1.951642	1.588407	1.181451	1.91024
secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols.flavanone 3-diox	at3g51240	Symbols: F3H, TT6, F3H   F3H (FLAVANC	2.009344	2.108543	1.326413	1.949527
secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols.flavonoid 3"-mon	at5g07990	Symbols: TT7, CYP75B1, D501   TT7 (TRA	2.188107	2.1943	1.698506	2.03369
secondary metabolism.flavonoids.flavonols	at5g08640	Symbols: FLS   FLS (FLAVONOL SYNTHA	2.200857	2.458798	2.377968	2.162696
secondary metabolism.flavonoids.flavonols.dihydrokaempferol 4-red	at2g45400	Symbols: BEN1   BEN1; binding / catalytic	3.197778	3.443175	3.034379	2.236845
secondary metabolism.flavonoids.isoflavonols	at4g39230	isoflavone reductase, putative   chr4:182651	3.408911	3.684484	3.411297	4.685325

**Tabla suplementaria 17.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en proteólisis para el genotipo NAT31. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

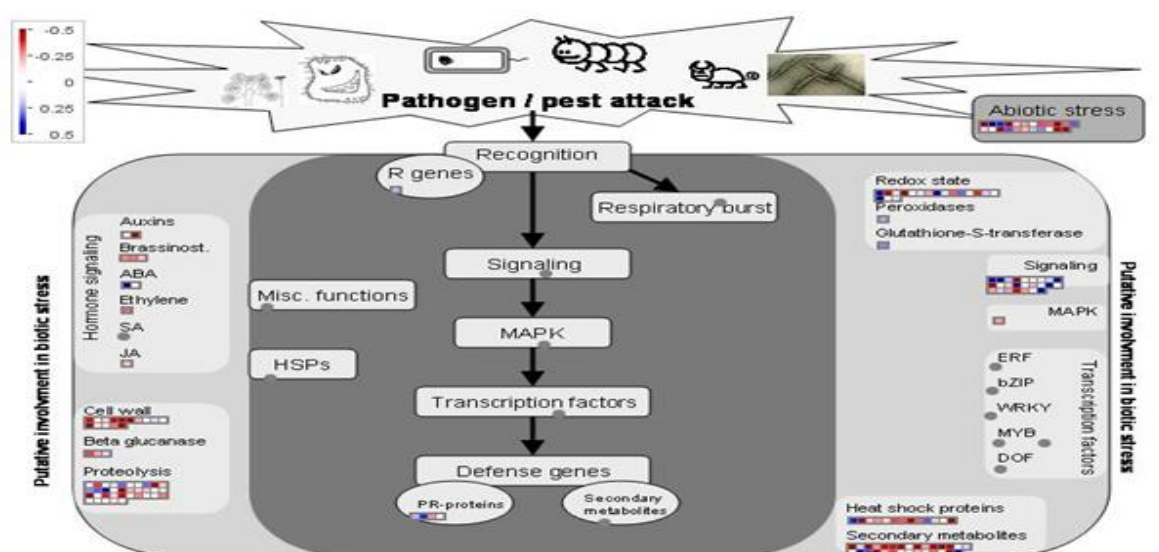
Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
protein.degradation	at5g65770	Symbols: LINC4   LINC4 (LITTLE NUCLE	-1.29389	-1.754	-2.50343	-1.09115
protein.degradation	at3g52500	aspartyl protease family protein   chr3:18	-0.75595	-1.14909	-1.44981	-0.9258
protein.degradation	at3g51800	Symbols: ATG2   ATG2; aminopeptidase	-0.61764	-0.70183	-1.13931	-0.80972
protein.degradation	at4g36760	Symbols: ATAPP1, APP1   ATAPP1; N	-0.45646	-0.61486	-0.94732	-0.68545
protein.degradation.subtilases	at5g67360	Symbols: ARA12   ARA12; serine-type e	-0.3908	-0.55598	-0.78596	-0.64825
protein.degradation.subtilases	at5g67090	subtilase family protein   chr5:26774018	-0.36627	-0.54324	-0.74434	-0.56457
protein.degradation.subtilases	at4g30020	subtilase family protein   chr4:14677285	-0.29143	-0.51598	-0.66633	-0.53673
protein.degradation.subtilases	at2g04160	Symbols: AIR3   AIR3; serine-type endo	-0.28022	-0.49506	-0.64378	-0.38398
protein.degradation.subtilases	at4g20430	subtilase family protein   chr4:11017656	-0.22663	-0.45334	-0.5498	-0.32605
protein.degradation.cysteine protease	at4g39090	Symbols: RD19, RD19A   RD19 (RESP	-0.19998	-0.39332	-0.47919	-0.31977
protein.degradation.aspartate protease	at1g03220	extracellular dermal glycoprotein, putativ	-0.18227	-0.37676	-0.45706	-0.31747
protein.degradation.serine protease	at3g27925	Symbols: DEGP1, Deg1   DEGP1 (Degf	-0.18148	-0.32331	-0.39715	-0.28165
protein.degradation.serine protease	at4g30810	Symbols: scpl29   scpl29 (serine carbox	-0.17045	-0.30103	-0.34929	-0.2635
protein.degradation.serine protease	at3g10410	Symbols: scpl49   scpl49 (serine carbox	-0.14553	-0.29521	-0.25693	-0.23919
protein.degradation.serine protease	at3g46860	serine protease inhibitor, potato inhibitor	-0.11242	-0.29074	-0.2235	-0.20594
protein.degradation.AAA type	at4g02480	AAA-type ATPase family protein   chr4:1	-0.09492	-0.25687	-0.10951	-0.18444
protein.degradation.ubiquitin	at2g47110	Symbols: UBQ6   UBQ6; protein binding	-0.05582	-0.20194	-0.06736	-0.13973
protein.degradation.ubiquitin	at1g04850	ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain	-0.05529	-0.1609	-0.05727	-0.09024
protein.degradation.ubiquitin	at2g17200	ubiquitin family protein   chr2:7481881-7	-0.05375	-0.14199	-0.04905	-0.0432
protein.degradation.ubiquitin	at4g10590	Symbols: UBP10   ubiquitin carboxyl-ter	-0.04393	-0.10467	0.038811	-0.02685
protein.degradation.ubiquitin	at3g11910	Symbols: UBP13   UBP13 (UBIQUITIN-S	-0.04226	-0.10418	0.073703	0.032425
protein.degradation.ubiquitin.E1	at5g06460	Symbols: ATUBA2, UBA 2   ATUBA2; u	-0.03298	-0.07965	0.076723	0.034729
protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	at3g16090	zinc finger (C3HC4-type RING finger) fan	-0.00361	-0.01492	0.079562	0.082485
protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	at1g03370	protein binding / zinc ion binding   chr1:8	0.004365	0.096786	0.12254	0.0913
protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	at5g60710	zinc finger (C3HC4-type RING finger) fan	0.009001	0.109033	0.14723	0.121917
protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin prote	at5g06600	Symbols: UBP12   UBP12 (UBIQUITIN-S	0.02973	0.138386	0.181496	0.220264
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at1g29150	Symbols: ATS9, RPN6   ATS9 (ARABID	0.030054	0.17928	0.215597	0.294649
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at2g05840	Symbols: PAA2   PAA2 (20S PROTEAS	0.054964	0.257495	0.282642	0.3834
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at5g19990	Symbols: RPT6A, ATSUG1   RPT6A (R	0.126948	0.475857	0.288295	0.488006
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at1g53750	Symbols: RPT1A   RPT1A (REGULATO	0.13309	0.493302	0.545387	0.554391
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at2g39990	Symbols: EIF2   EIF2; translation initiati	0.271124	0.614697	0.557579	0.559537
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at1g20200	Symbols: EMB2719, HAP15   EMB2719	0.30784	0.616528	0.639888	0.63897
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at2g32730	26S proteasome regulatory subunit, put	0.314355	0.719157	0.701276	0.836874
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at4g29040	Symbols: RPT2a   RPT2a (regulatory pa	0.32147	0.761213	1.120028	1.00495
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at4g31300	Symbols: PBA1   PBA1; endopeptidase	0.481463	1.122644	1.173251	1.082761



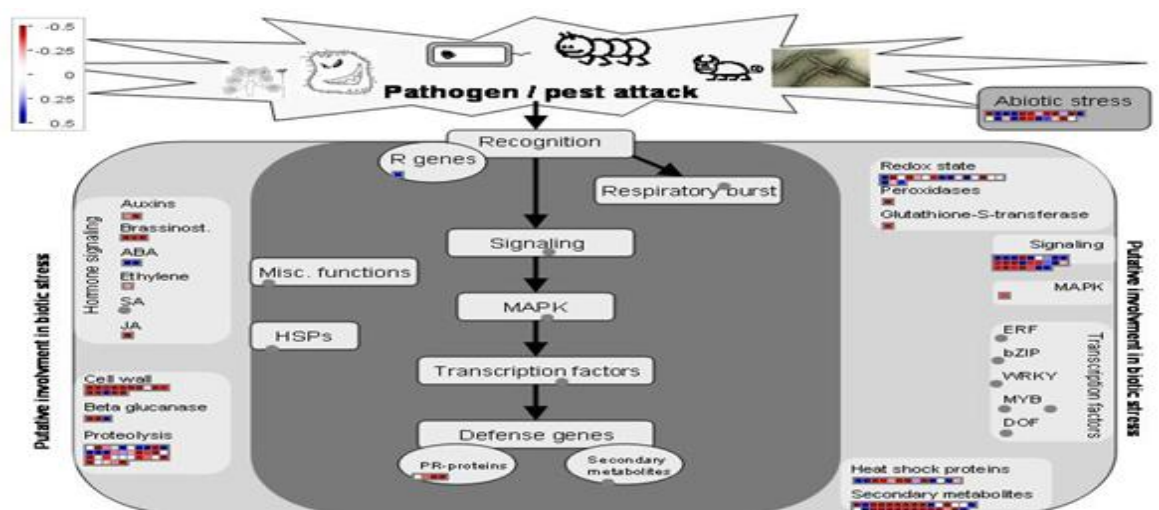
**Tabla suplementaria 18.** Proteínas inducidas y reprimidas identificadas mediante progénesis implicadas en proteólisis para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explica la regulación de las proteínas.

Proceso Biológico	Accesión	Descripción	6h	24h	4d	8d
protein.degradation	at4g29330	Symbols: DER1   DER1 (DERLIN-1)   chr4:29330-1	-3.227	-6.43126	-2.05196	-3.41077
protein.degradation	at4g04210	Symbols: PUX4   PUX4; protein binding	-1.46863	-2.73892	-1.9495	-2.28173
protein.degradation	at4g04860	Symbols: DER2.2   DER2.2 (DERLIN-2)	-1.01196	-1.11177	-0.94489	-1.10548
protein.degradation	at4g30920	cytosol aminopeptidase family protein   chr5:30920-1	-0.69924	-0.67231	-0.88124	-0.92279
protein.degradation	at5g51740	peptidase M48 family protein   chr5:210-1	-0.52482	-0.56746	-0.86846	-0.84204
protein.degradation	at5g65760	serine carboxypeptidase S28 family protein   chr5:65760-1	-0.50553	-0.50863	-0.756	-0.82632
protein.degradation	at5g42390	metalloendopeptidase   chr5:16945251-1	-0.41387	-0.42096	-0.74887	-0.75617
protein.degradation	at5g20660	24 kDa vacuolar protein, putative   chr5:20660-1	-0.39426	-0.34517	-0.70366	-0.70783
protein.degradation	at5g65620	peptidase M3 family protein / thimet oligopeptidase	-0.35985	-0.34437	-0.70271	-0.68302
protein.degradation	at1g50380	prolyl oligopeptidase family protein   chr1:50380-1	-0.30597	-0.32679	-0.6732	-0.61273
protein.degradation	at5g43600	Symbols: ATAAH-2, UAH   UAH (UREILIN-2)	-0.30502	-0.28343	-0.64634	-0.58244
protein.degradation	at4g36760	Symbols: ATAPP1, APP1   ATAPP1; Nucleoside diphosphate kinase	-0.26602	-0.2783	-0.5758	-0.56631
protein.degradation	at1g63770	peptidase M1 family protein   chr1:2365-1	-0.23424	-0.26941	-0.57215	-0.52637
protein.degradation	at4g01320	Symbols: ATSTE24, STE24   ATSTE24; STE24-like protein	-0.23173	-0.21616	-0.54613	-0.52331
protein.degradation	at1g73990	Symbols: SPPA   SPPA; serine-type endopeptidase	-0.19661	-0.2057	-0.53197	-0.51361
protein.degradation.subtilases	at3g14067	subtilase family protein   chr3:4658198-1	-0.19595	-0.19586	-0.52439	-0.47971
protein.degradation.cysteine.protease	at1g50670	OTU-like cysteine protease family protein   chr1:50670-1	-0.15884	-0.19046	-0.47369	-0.42721
protein.degradation.aspartate.protease	at1g11910	aspartyl protease family protein   chr1:4-1	-0.12162	-0.1548	-0.46649	-0.4001
protein.degradation.aspartate.protease	at1g01300	aspartyl protease family protein   chr1:1-1	-0.11358	-0.07704	-0.45921	-0.37535
protein.degradation.serine.protease	at4g20850	Symbols: TPP2   TPP2 (TRIPETIDYL AMINASE)	-0.09574	-0.07444	-0.45512	-0.3378
protein.degradation.serine.protease	at3g27925	Symbols: DEGP1, Deg1   DEGP1 (Deg1)	-0.07536	-0.05654	-0.4548	-0.2938
protein.degradation.serine.protease	at4g12910	Symbols: scpl20   scpl20 (serine carboxypeptidase)	-0.06424	-0.01547	-0.43836	-0.28996
protein.degradation.serine.protease	at4g17740	C-terminal processing protease, putative   chr4:17740-1	-0.03923	-0.00488	-0.41795	-0.28533
protein.degradation.serine.protease	at4g30810	Symbols: scpl29   scpl29 (serine carboxypeptidase)	-0.00171	0.032696	-0.39234	-0.27812
protein.degradation.serine.protease	at3g10410	Symbols: scpl49   scpl49 (serine carboxypeptidase)	0.003776	0.048665	-0.37503	-0.24988
protein.degradation.serine.protease	at1g15000	Symbols: scpl50   scpl50 (serine carboxypeptidase)	0.049933	0.048832	-0.37423	-0.24285
protein.degradation.serine.protease	at1g28110	Symbols: SCPL45   SCPL45 (SERINE CARBOXYPEPTIDASE)	0.063243	0.074239	-0.36782	-0.23887
protein.degradation.serine.protease	at4g36195	serine carboxypeptidase S28 family protein   chr4:36195-1	0.067446	0.096196	-0.34533	-0.21903
protein.degradation.serine.protease	at5g42240	Symbols: scpl42   scpl42 (serine carboxypeptidase)	0.073359	0.096456	-0.31178	-0.13835
protein.degradation.metalloprotease	at2g30950	Symbols: VAR2, FTSH2   VAR2 (VARIANSE)	0.081491	0.100041	-0.24989	-0.13391
protein.degradation.metalloprotease	at5g42270	Symbols: VAR1, FTSH5   VAR1 (VARIANSE)	0.101525	0.107014	-0.24327	-0.08751
protein.degradation.metalloprotease	at1g17870	Symbols: ATEGY3, EGY3   EGY3 (ETHANOLAMINE N-METHYLTRANSFERASE)	0.112385	0.110473	-0.23614	-0.06627
protein.degradation.metalloprotease	at1g09300	metallopeptidase M24 family protein   chr1:9300-1	0.1285	0.124988	-0.23577	-0.05474
protein.degradation.metalloprotease	at2g26140	Symbols: ftsH4   ftsH4 (FtsH protease 4)	0.135086	0.135748	-0.22288	-0.03856
protein.degradation.metalloprotease	at1g70170	Symbols: MMP   MMP (MATRIX METALLOPROTEINASE)	0.13726	0.173432	-0.18962	-0.0188
protein.degradation.metalloprotease	at3g19170	Symbols: ATPREP1, ATZNMP   ATPREP1	0.150986	0.174835	-0.14052	-0.01245
protein.degradation.metalloprotease	at2g32480	membrane-associated zinc metalloprotease	0.151447	0.175642	-0.14025	-0.00797
protein.degradation.metalloprotease	at2g45240	Symbols: MAP1A   MAP1A (METHIONINE SULFOXYLASE)	0.168327	0.213087	-0.13431	0.027458
protein.degradation.AAA.type	at4g02480	AAA-type ATPase family protein   chr4:2480-1	0.204665	0.22388	-0.08953	0.052282
protein.degradation.AAA.type	at5g64580	AAA-type ATPase family protein   chr5:64580-1	0.205699	0.224484	-0.08858	0.052847
protein.degradation.ubiquitin	at1g65650	Symbols: UCH2   UCH2; ubiquitin thiolesterase	0.217707	0.225945	-0.08837	0.076719
protein.degradation.ubiquitin	at2g12550	ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain protein	0.227152	0.233782	-0.02831	0.087021
protein.degradation.ubiquitin	at5g50680	Symbols: ATSAE1B, SAE1B   SAE1B (SUMO1-UBA)	0.242284	0.234718	0.005426	0.150761
protein.degradation.ubiquitin	at5g15400	U-box domain-containing protein   chr5:15400-1	0.248261	0.251767	0.02357	0.205709
protein.degradation.ubiquitin	at4g22290	ubiquitin thiolesterase   chr4:11782905-1	0.275142	0.259114	0.098823	0.235036
protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin	at5g55160	Symbols: SUM2, SUMO 2, SUMO2, ATSUMO2	0.297883	0.30849	0.122503	0.296326
protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin	at4g06599	ubiquitin family protein   chr4:3665925-3	0.306408	0.328061	0.131047	0.359269
protein.degradation.ubiquitin.E1	at2g21470	Symbols: SAE2, ATSAE2, EMB2764   EMB2764 (SUMO1-UBA)	0.325412	0.367966	0.19839	0.362566
protein.degradation.ubiquitin.E1	at5g06460	Symbols: ATUBA2, UBA 2   ATUBA2; ubiquitin-conjugating enzyme E2	0.336966	0.378744	0.227485	0.375363
protein.degradation.ubiquitin.E3.HECT	at4g38600	Symbols: KAK, UPL3   KAK (KAKTUS)	0.392607	0.382497	0.230242	0.375673
protein.degradation.ubiquitin.E3.HECT	at1g70320	Symbols: UPL2   UPL2 (UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE)	0.451576	0.423216	0.255422	0.381075
protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	at3g19950	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0.457509	0.455573	0.268124	0.398077
protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	at1g03370	protein binding / zinc ion binding   chr1:3370-1	0.478069	0.475327	0.285102	0.436096
protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF	at2g03170	Symbols: ASK14   ASK14 (ARABIDOPSIS SCF-1)	0.568312	0.539213	0.316006	0.45729
protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF	at4g02570	Symbols: ATCUL1, CUL1, AXR6   ATCL1	0.634426	0.547224	0.325587	0.52396
protein.degradation.ubiquitin.E3.DCX	at4g05420	Symbols: DDB1A   DDB1A (DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1)	0.654739	0.604776	0.352101	0.538712
protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin.pr	at3g20630	Symbols: UBP14, TTN6, ATUBP14   UBP14	0.704546	0.625719	0.39729	0.572754
protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin.pr	at5g06600	Symbols: UBP12   UBP12 (UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE)	0.722724	0.658883	0.400751	0.621978
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at3g22110	Symbols: PAC1   PAC1; endopeptidase	0.801287	0.774461	0.472922	0.654806
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at5g19990	Symbols: RPT6A, ATSUG1   RPT6A (R26)	0.802996	0.786272	0.517067	0.840621
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at1g56450	Symbols: PBG1   PBG1; peptidase/threonine-specific	0.807579	0.886085	0.553817	0.845478
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at2g39990	Symbols: EIF2   EIF2; translation initiation factor	0.883738	0.912248	0.574994	0.888411
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at3g27430	Symbols: PBB1   PBB1; endopeptidase	0.89437	1.012122	0.633623	0.896978
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at3g14290	Symbols: PAE2   PAE2; endopeptidase	1.055383	1.04406	0.78925	0.943054
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at5g45620	26S proteasome regulatory subunit, putative	1.086977	1.185106	0.802793	1.479121
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at3g26340	20S proteasome beta subunit E, putative	1.200536	1.528718	0.817592	1.690901
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at5g15610	proteasome family protein   chr5:507951-1	1.235711	1.599482	0.823302	2.192131
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at2g32730	26S proteasome regulatory subunit, putative	1.817724	1.844699	0.92384	2.327301
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at2g27020	Symbols: PAG1   PAG1; endopeptidase	2.907151	2.014439	1.020264	2.654202
protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at4g19006	26S proteasome regulatory subunit, putative	3.016048	2.172286	2.011425	2.748496

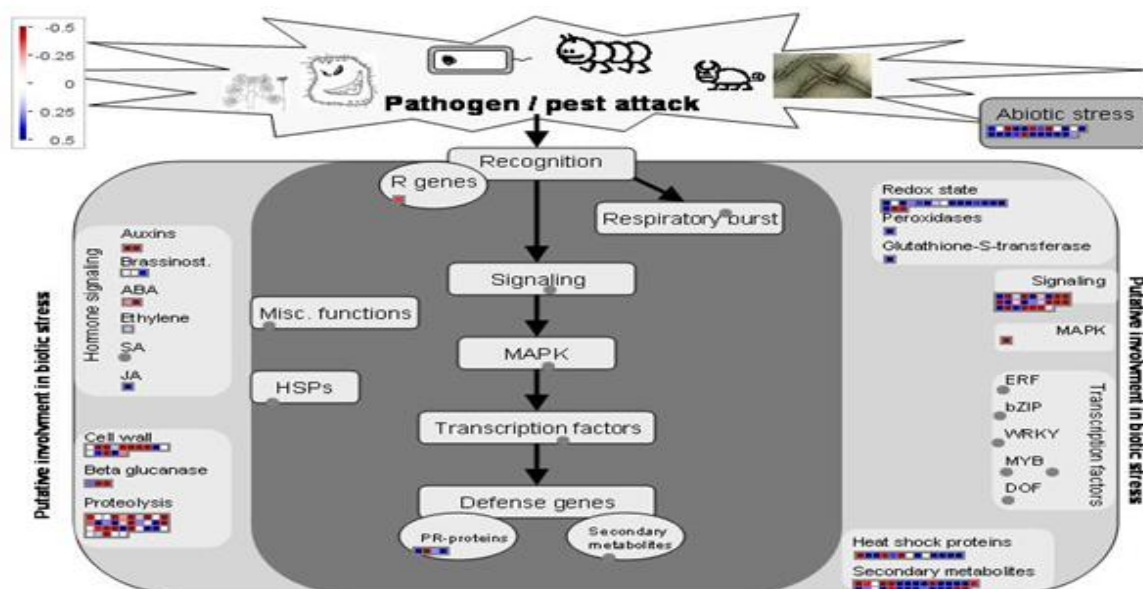
**Figura suplementaria 1.** Mapa de proteínas para estrés biótico para e genotipo NAT-31 a las 6 horas de evaluación.



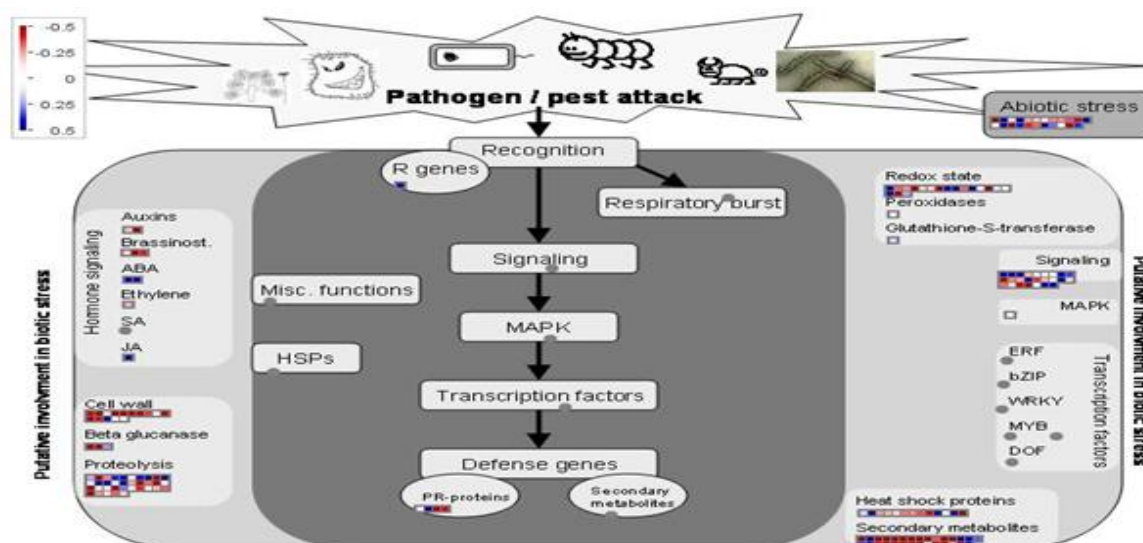
**Figura suplementaria 2.** Mapa de proteínas para estrés biótico para e genotipo NAT-31 a las 24 horas de evaluación.



**Figura suplementaria 3.** Mapa de proteínas para estrés biótico para e genotipo NAT-31 a las 4 días de evaluación.

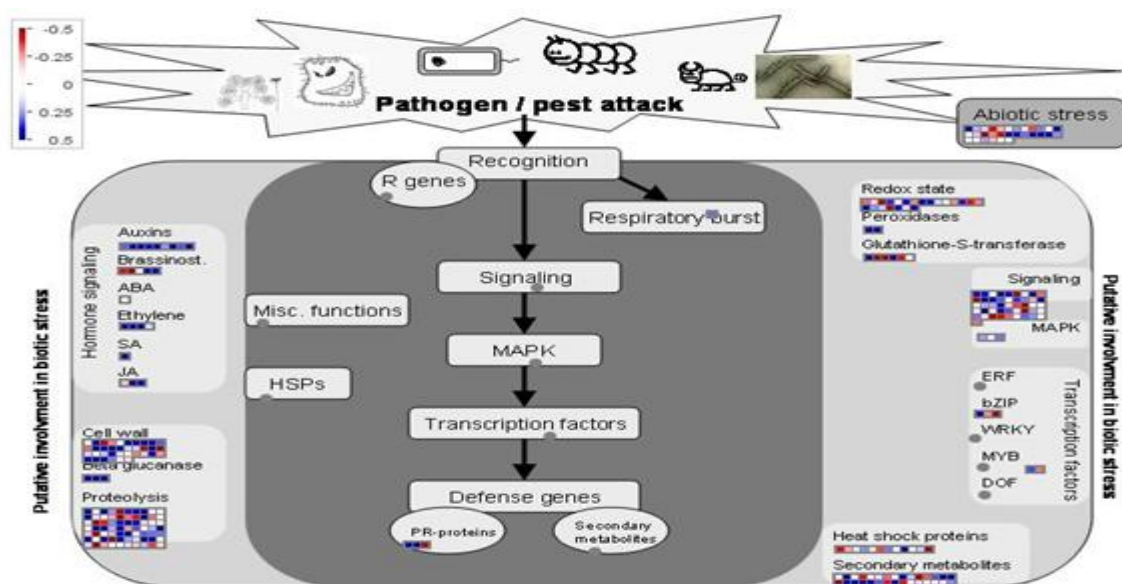


**Figura suplementaria 4.** Mapa de proteínas para estrés biótico para e genotipo NAT-31 a las 8 días de evaluación.

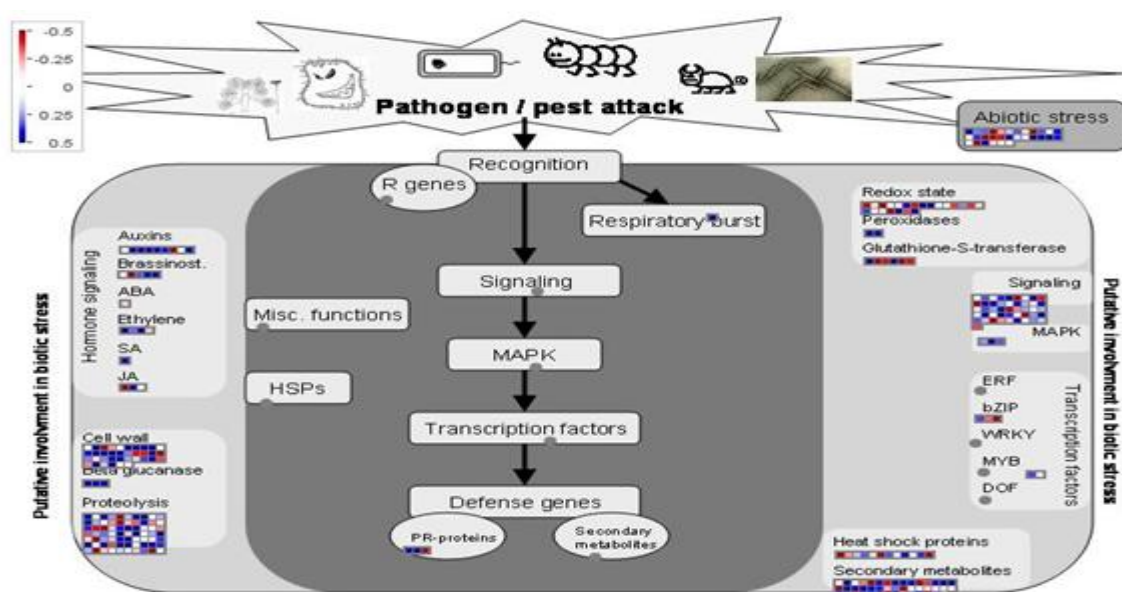




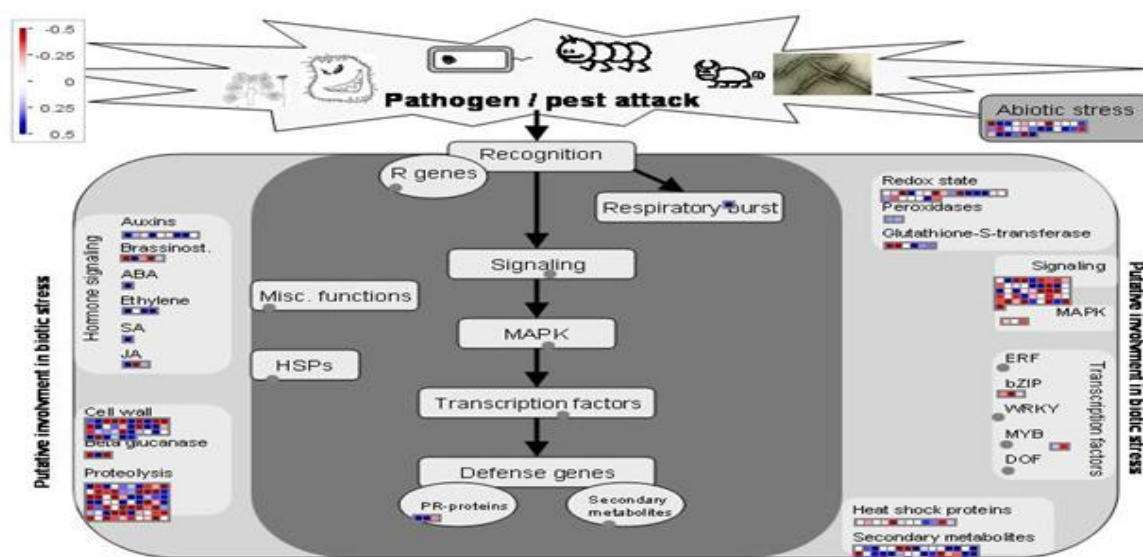
**Figura suplementaria 5.** Mapa de proteínas para estrés biótico para e genotipo 60444 a las 6 horas de evaluación.



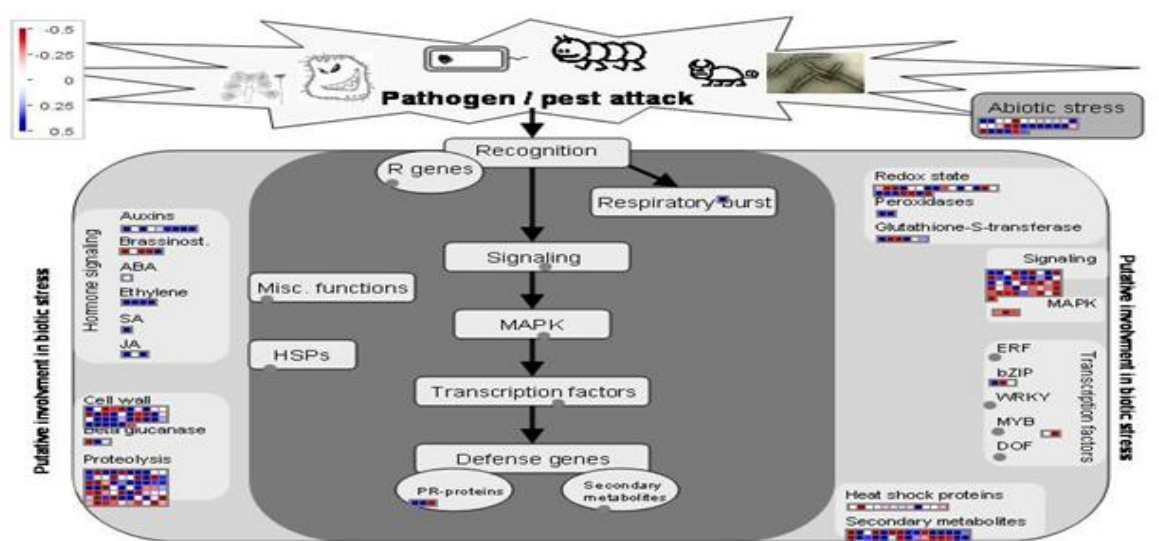
**Figura suplementaria 6.** Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo 60444 a las 24 horas de evaluación.



**Figura suplementaria 7.** Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo 60444 a los 4 días de evaluación.



**Figura suplementaria 8.** Mapa de proteínas para estrés biótico para el genotipo 60444 a los 8 días de evaluación.





**Anexo A.** Diseño del experimento a no libre escogencia para los análisis proteómicos. Las muestras fueron servidas en el gel de forma aleatoria en cada uno de los pozos para cada uno de los tiempos (0h, 6h, 24h, 4d, 8d) y las dos muestras analizadas (NAT-31 y 60444). Después de la corrida del gel por 16 horas, el gel se corto en 5 fracciones homogéneas.

<b>Muestras</b>	<b>Tiempos</b>	<b>Fracción del gel (Tienen el mismo tamaño)</b>	<b>Condición (Las muestras fueron colocadas de forma aleatoria para el análisis)</b>
Hojas de NAT-31	0h	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de NAT-31	6h	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)

			4x resistentes)
Hojas de NAT-31	24h	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de NAT-31	4 días	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de NAT-31	8 días	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)

		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de 60444	0h	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de 60444	6h	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de 60444	24h	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)

		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de 60444	4 días	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
Hojas de 60444	8 días	Fracción 1	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 2	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 3	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 4	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)
		Fracción 5	Aleoteorización de 8 muestras (4x susceptibles, 4x resistentes)

**Anexo B.** Extracción de proteína con SDS y buffer urea (Vanderschuren et al., 2014).

- Buffer de extracción urea: 8 M urea, 20 mM Tris base, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 x inhibidor de proteasa.
- Buffer de extracción SDS: 4% SDS, 40 mM Tris base, 2x inhibidor de proteasa.

1. Macere el tejido de la planta con un macerador y mortero con nitrógeno líquido.
2. Pese el material macerado, haga dos alícuotas con 50 mg en tubos eppendorf.
3. Para la primera alícuota, adicione 200 ul de buffer de extracción urea, y a la otra 200 ul de buffer de extracción SDS.
4. Incube por 30 minutos a temperatura ambiente con vortex y sacudiendo.
5. Centrifugue a temperatura ambiente por 10 minutos a 16.1 rtf en una centrifuga tabletop.
6. Transfiera el sobrenadante a un tubo de ultracentrífuga.
7. Ultracentrifugación a 55.000 rpm por 45 minutos a temperatura ambiente.
8. Haga un ensayo de BCA para estimar la concentración de proteína.

**Anexo C.** Estimación de concentración de proteína mediante colorimetría con ensayos de BCA proteína.

Esquema de pipeteo:

<b>Concentración Estándar [ug proteína]</b>	0	4	8	12	16	20	24
Stock BSA 2 ug/ul [ul]	0	2	4	6	8	10	12

Muestra	4
H <sub>2</sub> O	96

Este ensayo es compatible con detergentes iónicos y no iónicos. Este es sensible a agentes reductores, como 1 mM DTT. El ensayo es diseñado para cuantificar de 1 a 40 ug de proteína.

1. Realice el esquema de arriba en tubos eppendorf de 1.5 ml. Para las muestras, haga dos replicas.
2. Adicione 1 ml de reactivo de trabajo BCA (Reactivo de trabajo BCA es preparado por mezcla de 1 parte de reactivo B y 50 partes de reactivo B) para todas las muestras.
3. Incube las muestras a 37°C por 30 minutos.
4. Transfiera todas las muestras a una cubeta de 1 ml y mida la absorbancia a 562 nm. La muestra que contiene solo reactivo de trabajo BCA (0 ul BSA) es usada como blanco.
5. Calcule el promedio de concentración de proteína de las dos replicas por muestra.

**Anexo D.** Preparación y corrida del gel en una dimensión (1DE).

1. Muestras sujetas a 1D SDS-PAGE. Se preparó una electroforesis de 1 dimensión de 12.5 % SDS gel de poliacrilamida usando una cámara de electroforesis “Ettan DaltII System Gel Caster (GE healthcare UK)”. El gel se arma con la ayuda de un par de vidrios estilo sandiwisch, el cual lleva separadores con el fin de establecer el grosor del gel. Se sirvieron 180 ug de proteína de cada una de las muestras.
2. Electroforesis. Las muestras fueron corridas por 16 h a 100 voltios.
3. El gel fue teñido con Coomassie azul brillante R 250.
4. Cada línea corresponde a una réplica, la cual fue cortada en cinco piezas iguales longitudinalmente y transversalmente hasta obtener piezas pequeñas.
5. Las piezas del gel fueron desteñidas, lavadas y digeridas tripticamente según Shevchenko et al. (1996) a incubación toda la noche a 30°C.
6. Los péptidos fueron eluidos y purificados usando un Sep-Pak reverse-phase.

**Anexo E.** Digestión con tripsina y extracción de péptidos.

1. 3 x 1 ml de solución de desteñido (50% MeOH en 100 mM AmBic) son adicionados a las piezas del gel e incubadas por cerca de 1h cada vez a 37°C.
2. Lavar con 1 ml de agua.
3. Almacenar a -20°C.
4. Las piezas del gel son lavadas con 1 ml de agua.
5. Lavar 3x por cerca de 15' en 1 ml de 50% ACN.
6. Secar en Speed Vac por 45 min.
7. Es posible almacenar a -20°C.
8. Adicione, 500 ul 10 mM DTT en 5 mM AmBic pH 8.0 e incubar por 45' a 50°C.
9. Remover la solución de DTT, adicionar 750 ul 50 mM IAM en 50 mM AmBic pH 8.0 e incubar por > 1h a temperatura ambiente en la oscuridad.
10. Remover IAM y lavar las piezas del gel 3 x en 1 ml de 50% ACN.
11. Secar en Speed Vac por cerca de 30 min.
12. Es posible almacenar a -20°C.
13. Adicionar 500 ul de solución de tripsina (20 ug de tripsina en 4.2 ml 50mM AmBic pH 8.0); después mezcle los componentes, verifique el pH entre 7.5 y 8.5. Las piezas del gel son guardadas a 4°C por 45'.
14. Adicionar 50 mM de solución AmBic hasta cubrir completamente las piezas del gel.
15. Incube toda la noche a 30°C.



16. Adicionar 500 ul H<sub>2</sub>O, incubar por > 20', centrifuge por 4' y el sobrenadante es colectado.
17. Speed Vac.
18. Adicionar 500 ul 5% Acido fórmico y 50% de ACN, incubar por > 20', centrifugue por 4' y el sobrenadante es colectado (realizar tres veces).
19. Speed Vac.
20. Adicionar 500 ul 5% Acido formico y 50% de ACN, incubar por > 20', centrifuge por 4' y el sobrenadante es colectado.
21. Speed Vac.
22. Adicionar 500 ul 5% Acido formico y 50% de ACN, incubar por > 20', centrifugue por 4' y el sobrenadante es colectado.
23. Speed Vac.
24. Los péptidos son secados en Speed Vac y almacenados a -20°C (Tambien las piezas del gel son secadas en Speed Vac y almacenadas a -20°C).

## **Anexo F. Purificación de péptidos (Protocolo ZIPTIP).**

1. Resuspender las muestras en BUFFER A (3% ACN, 0.2% TFA), 20ul.
2. Desalinar los péptidos usando la fase reversa u-C18 ZipTips.

### **Procedimiento ZIPTIP**

#### **Soluciones**

##### **Solución de Wetting**

100% ACN

##### **Solución de Lavado**

3-5% ACN; 0.1% TFA

##### **Solución de Elución**

50-60% ACN; 0.1% TFA

### **Protocolo**

#### **Preparación de la muestra**

1. Tomar 20 ul de solución de lavado.
2. 10 ul en solución de wetting por 3x.
3. 10 ul en solución de lavado por 3x.
4. Tomar 10 ul de la muestra (Repipetear 3 a 10x).
5. 10 ul de solución de lavado por 2 a 3x.

6. Eluir con 10 ul por 2x.
7. Secar en Speed Vac por 30 min.
8. Resuspender las muestras en 3% ACN, 0.1% FA en 10 ul.
9. Vortex a temperatura ambiente por 10-15 min.
10. Centrifugar.
11. Leer en el espectrofotómetro.